

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Streptococcus pneumoniae y Staphylococcus aureus :  
enfermedad invasiva, biofilm y terapia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Julio Sempere García**

Directores

**José Enrique Yuste Lobo  
Mirian Domenech Lucas**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

***Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*: enfermedad invasiva, biofilm y terapia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Julio Sempere García**

DIRECTORES

**José Enrique Yuste Lobo**

**Mirian Domenech Lucas**

Madrid, 2022





## Agradecimientos

Llevaba meses pensando en que por fin llegaría el momento de escribir los agradecimientos y sería lo más fácil, y ahora me encuentro enfrentándome a estos sin saber muy bien lo que escribir. El primer consejo que daría a alguien que va a realizar una tesis doctoral: no dejes nada para el final, ni siquiera los agradecimientos.

Lo primero de todo quiero agradecer a mis dos directores de tesis José y Miri. Quiero empezar contando cómo acabé en el laboratorio de neumococos del CNM-ISCIH. Cursando tercero de Bioquímica en la UCM me uní al proyecto de aprendizaje-servicio SWI (actualmente MicroMundo) y me tocó en el equipo de la profesora Covadonga Vázquez (aquí una pequeña pausa para agradecer a Cova todo lo que ha hecho por mí) y a la vez cursaba microbiología clínica con la profesora M<sup>a</sup> José Valderrama (que quiero agradecerle por esa asignatura que me hizo meterme de lleno en la micro clínica y por convencerme para cursar el Máster de Microbiología). Con estas experiencias quise buscar laboratorio para realizar prácticas extracurriculares antes de empezar el TFG, y el “bicho” que más me interesó fue mi querido neumococo. Me recomendaron encarecidamente que me fuese al CIB a realizar estas prácticas con Miri. ¡La sorpresa que me llevé cuando me rechazó! ¡Viniendo con recomendación y todo...! Lo que no sabía era que el destino no la iba a dejar librarse de mí. La otra opción para trabajar con este patógeno tan “chulo” era el laboratorio de referencia de neumococo en el CNM-ISCIH. Así que gracias a José, acabé realizando las prácticas extracurriculares en la unidad de neumococos y de ahí nadie me ha movido. La siguiente sorpresa, o destino, fue que Miri acabó uniéndose al laboratorio cuando yo iba a empezar mi TFM y al final tuvo no sólo que tragarme y aguantarme durante un curso escolar, sino durante toda mi tesis y mucho más allá. La conclusión de esta historia, y eso que yo, lo que es concluir, concluir, no sé, es que es muy difícil librarse de mí, y que a veces en la vida ocurren estas cosas.

Después de haberme enrollado, como siempre, empiezo a agradecer de verdad. Miri y José, muchísimas gracias, pero de verdad, muchísimas gracias, por todo lo que habéis hecho por mí. No sabéis la suerte que he tenido, cruzarme con gente que no sólo te dirige, sino que te hagan sentir pasión por lo que haces es muy difícil. José, por lo que has luchado por mi continuidad en el centro, estaré siempre eternamente agradecido. Miri, por aguantarme por pelearme y por todo, por estar siempre ahí que lo necesito. A ambos, por todos los buenos momentos, por esas risas y esos motes, por todas las discusiones

de ciencia y cotilleos no científicos, por los congresos, por crear un ambiente que haga que quiera continuar en la ciencia en la investigación, por los “persimonios”, por todo...

Después me gustaría agradecer a mi laboratorio de neumos, a lo que ha sido mi familia del CNM-ISCIH. La primera que me acogió, mi Lolita, la vida del centro, de Majadahonda y de España. Nunca he echado más de menos a una persona, tu ausencia desde que te jubilaste se nota cada día. Me enseñaste “la microbiología de verdad no esas tontás que os enseñan en la facultad”, me acogiste y me protegiste como a un polluelo cuando estaba perdido y no sabía ni rotular los tubos bien. Qué peleas teníamos, qué gritos pegábamos, qué risas echábamos, qué buenos momentos. A Bea e Idoia, qué buenos momentos hemos pasado, cuánto tiempo compartido y muchas gracias por toda la ayuda. También quiero agradecer a Mirella, que llegó y nos encerraron tres meses en casa, que ha sido un apoyo y ayuda constante. Por último, de mi lab de neumó quieró agradecer a mis “polluelos”: a Covi que, aunque me la liase con la placa de secuenciación y yo la amenazase de morirme del disgusto, siempre ha sido un placer trabajar con ella y a Darío, el peleón, que te preguntaba por qué, cómo, pero y sí, etc. con cada paso de cada protocolo, pero hacía todo con entusiasmo y determinación. Por todos los momentos junto a mis compañeros, por buscar una excusa semanal para traer bollos del Atuel, muchas gracias.

Del CNM no me puedo olvidar de las chicas de Taxo: Sylvia, Pilar y Silvia. Muchas gracias por tantas comidas juntos, compartiendo tantas ideas, tantas recetas, tantos momentos, muchas gracias por todo. También a Cris y Raquel, que desde el covid han estado aguantándome todos los días, por esas comidas incluso en los peores momentos, por las largas conversaciones de a ver cuándo me vacunan o qué mal la situación laboral en la ciencia, por todos los consejos, muchas gracias. A Fede de intrahospitalarias, que me prestó toda la colección de *S. aureus* que hizo posible esta tesis, que nos traía bombones cada vez que se iba de viaje, por todos los buenos momentos celebrando cumpleaños y despedidas. Muchas gracias también a Isa, Manu, M<sup>a</sup> José, Elena y mucha gente más que cada día da vida al centro.

De la Complu no puedo olvidarme de las chicas del laboratorio 7 de micro, a Cova y Belén, muchas gracias por vuestros consejos y por guiarme también. A Jessi, Marta, Carol y Clara, al ya pasado pero presente en nuestros corazones Alex. También a mis amigos del máster, “bacilux de verdad”: Alonso, Estela, Ahlam, Josu, Patri, Nerea y Alex (le

menciono dos veces por si en un futuro se hace importante que el peloteo sirva de algo). Yéndome un poco más al pasado no puedo olvidarme de mis compañeras de bioquímica, pero sobre todo amigas de toda la vida, Alba, Luci y Ana. Hemos pasado tantos buenos momentos durante los años que hemos pasado juntos, tanto para ser “los que no tienen amigos”...no he podido tener más suerte con la gente que me ha tocado vivir estos años de formación.

Ahora por último ya me voy a mi familia (tanto de sangre como mi “núcleo”). Lo primero de todo agradecer a mis padres, Remo y Alicia, porque gracias a ellos estoy (literalmente) donde estoy. ¡Lo que han tenido que aguantar! El esfuerzo que mis padres han hecho toda mi vida, tanto en lo personal como en lo educativo, para poder acceder a todo y llegar a este momento es algo que nunca les podré recompensar. Todas las horas que han sacrificado para llevarme a los sitios, para que hiciese las actividades extraescolares, para que estudiase, para que disfrutase, para todo. Os quiero y no he podido tener más suerte (aunque haya repetido esto ya unas 700 veces durante los agradecimientos). Muchas gracias y esto no podría haber ocurrido sin vosotros. No me olvido de mi hermana, Virginia, que es la persona en quien más confío y a quien más quiero en el mundo. Hemos discutido, nos hemos pegado, nos hemos perdonado, pero un buen hermano es lo mejor que te puede pasar y yo tengo la mejor hermana del mundo. Aunque diga que ella es la guapa y yo soy el listo (cuando sabe que yo soy el listo Y el guapo). A Eusti, mi gata, por estar (obviamente). A Roci, por ser una alegría constante y preocuparse tanto por mí, por estar ahí siempre que la necesito y acogirme siempre con un cariño enorme. También quiero agradecer a mis tíos más cercanos, tía Emi, tía Luisa, tío Luis, tía Leo y más parte de mi familia por todo su apoyo durante mi vida.

De mi otra familia, mi núcleo, que me han soportado durante todos estos años, y han hecho que estos dos últimos gracias a la \*\*\*\*\* de coronavirus hayan sido llevaderos, muchísimas gracias. A Dani, una de las personas más generosas que he conocido y conoceré en mi vida. No me voy a poder librar de tí en mi vida, esto es a lo que llaman familia elegida. A Momo, que me enseña lo que es ser asertivo, que me confía y a quien confío todo, que me ha hecho la vida mucho más feliz y llevadera. A Inés, que me ha enseñado lo que es ser fuerte, con la que he vivido aventuras en hostales de mala muerte, con la que he pasado de los mejores momentos de mi vida. A Víctor, la persona que más me tiene que aguantar y aun así sigue pasando todo el tiempo conmigo, la persona que ha sido mi apoyo diario estos dos últimos años y con la que podría pasar toda mi vida y

muchas más. A todos, os quiero muchísimo y muchas gracias, pero de verdad de la buena. No me olvido tampoco de Anita, que me deja tener el privilegio de ser una de las pocas personas en denominarla con ese -ita; de Irene, que desde que se ha ido a Suecia me falta una persona en mi vida, mi compañera de gimnasio de carreras y de cotilleos; de Laura, feita, y las tardes de jueguitos; de Adrián, que aguantó mi jugada maestra del Avalon; de Alberto y sus bíceps; de mis compañeros de mi peor vicio, el “League of Legends”, que amenizan mis tardes y me acompañaron durante toda la pandemia; tampoco me olvido de la gente del pasado, que ya no está en mi vida y han aportado cosas buenas y cosas malas. También dije que agradecería en mi tesis a la saga Crepúsculo y a Lady Gaga, y no faltaría menos después de la cantidad de veces que he podido consumir su contenido en mi vida.

Como no, me he enrollado escribiendo los agradecimientos, pero uno es como es (en mi caso pesado) y tiene que convivir con ello. Quiero acabar citando a mi directora de tesis: y ahora preparaos para un trocito de ciencia...

**A mis padres, Alicia y Remo**  
**A mi hermana, Virginia**  
**A mi núcleo, Vic, Inés,**  
**Momo y Dani**



## ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (<https://iupac.org/what-we-do/nomenclature/>), en esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes abreviaturas:

ADNe, ADN extracelular que forma parte de la matriz del biofilm.

AMX, amoxicilina.

Bap, proteína asociada a biofilm de *S. aureus*.

BSA, seroalbúmina bovina.

C+Y, medio CpH8 suplementado con extracto de levadura al 0.08%.

CBP(s), proteína(s) de unión a colina.

CC, complejo clonal.

CDN, cefditoren.

CFD, cefpodoxima.

CFX, cefixima.

cgMLST, *core genome* MLST (definición más abajo)

CMI, concentración mínima inhibitoria.

CLSI, Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico.

CLSM, microscopía de barrido láser confocal.

CP5, serotipo capsular 5 de *S. aureus*.

CP8, serotipo capsular 8 de *S. aureus*.

CPS, polisacárido capsular.

CRO, ceftriaxona.

CRP, proteína C-reactiva.

CSP, péptido estimulador de competencia.

CTX, cefotaxima.

CV, solución de cristal violeta al 1% en agua.

Cys, cisteamina.

DDAO, 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona).

DMI, dispositivo médico invasivo.

DOC, desoxicolato sódico.

EC, exudado cutáneo.

EH, exudado de herida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

EHT, extracto de humo de tabaco.  
EITRI, enfermedades infecciosas del tracto respiratorio inferior.  
EN, exudado nasofaríngeo.  
ENI, enfermedad neumocócica invasiva.  
EP, exudado perianal.  
EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica.  
EPS, sustancias poliméricas extracelulares.  
ERY, eritromicina.  
ET(A/B), toxinas exfoliativas.  
EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.  
fH, factor H.  
FITC, isotiocianato de fluoresceína.  
GS, glándula suprarrenal.  
HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution*.  
HL-60, línea celular que se diferencia a neutrófilos.  
LB, lavado broncoalveolar.  
LCR, líquido cefalorraquídeo.  
LRN, laboratorio de referencia de neumococos.  
LIH, laboratorio de infecciones intrahospitalarias.  
L-PL, líquido pleural.  
LTAs, ácidos lipoteicóicos.  
LVX, levofloxacino.  
MAC, complejo de ataque a la membrana.  
MLST, tipificación mediante secuenciación multilocus o *multilocus sequence typing*.  
NAC, *N*-acetil-L-cisteína.  
NP, necropsia pulmonar.  
Nuc, termonucleasa extracelular de *S. aureus*.  
·OH, radicales hidroxilo.  
Opt, optoquina.  
PBP, proteínas de unión a penicilina.  
P-Cho, fosforilcolina  
PEN, penicilina.  
PIA, adhesina de polisacárido intercelular, también llamado PNAG.  
PlyA, neumolisina.  
PNAG, poly- $\beta$ (1-6)-*N*-acetilglucosamina, también llamado PIA.

PVL, leucocidina de Panton-Valentine.

QS, *quorum sensing*.

SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

SARM-AH, SARM asociado a hospitales.

SARM-AC, SARM adquirido en comunidad.

SARM-AG, SARM asociado a ganado.

SASM, *S. aureus* susceptible a meticilina.

ST(s), secuencitipo(s).

Tampón SP, tampón fosfato sódico 20 mM (ajustado a pH 6.9, salvo indicación en contra).

TAs, ácidos teicóicos.

TSA, agar de tripticaseína.

TSB, caldo de tripticaseína.

TSBGY, TSB suplementado con glucosa (0.4%) y extracto de levadura (0.3%).

TSST, toxina del síndrome del *shock* tóxico.

UFC, unidades formadoras de colonias.

VNC(7/13/15/20), vacuna neumocócica conjugada (7/13/15/20)-valente.

VNP23, vacuna neumocócica polisacáridica 23-valente.

WGA, aglutinina de germen de trigo (*Triticum vulgare*).



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| RESUMEN.....  | i         |
| SUMMARY .....   | v         |
| <b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: CARACTERÍSTICAS Y PATOGÉNESIS .....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1. Aspectos históricos .....  | 3         |
| 1.2. Características generales.....                                       | 4         |
| 1.2.1. Polisacárido capsular, genes capsulares y tipificación .....       | 5         |
| 1.2.2. Proteínas de unión a colina o CBPs .....                           | 7         |
| 1.3. Importancia clínica.....   | 10        |
| 1.3.1. Vacunas frente a <i>S. pneumoniae</i> .....                        | 12        |
| 1.3.2. Impacto de las vacunas en la enfermedad neumocócica invasiva ..... | 15        |
| 1.3.3. Resistencia a antibióticos .....                                   | 15        |
| 1.4. Patogénesis de la enfermedad neumocócica .....                       | 17        |
| 1.4.1. Adhesión y colonización.....                                       | 17        |
| 1.4.2. Invasión, inflamación y shock .....                                | 19        |
| 1.5. Sistema inmune y <i>S. pneumoniae</i> .....                          | 20        |
| 1.5.1. El sistema del complemento.....                                    | 20        |
| 1.5.2. Fagocitosis y receptores celulares.....                            | 24        |
| <b>2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS: CARACTERÍSTICAS Y PATOGÉNESIS.....</b>       | <b>26</b> |
| 2.1. Aspectos históricos .....  | 26        |
| 2.2. Características generales.....                                       | 27        |
| 2.2.1. Polisacárido capsular en <i>S. aureus</i> .....                    | 28        |
| 2.3. Importancia clínica de <i>S. aureus</i> .....                        | 29        |
| 2.3.1. <i>S. aureus</i> resistente a metilina.....                        | 31        |
| 2.4. Mecanismos de patogenicidad de <i>S. aureus</i> .....                | 32        |
| 2.4.1. Adhesión y colonización .....                                      | 32        |
| 2.4.2. Las toxinas de <i>S. aureus</i> .....                              | 34        |
| 1.5. Sistema inmune y <i>S. aureus</i> .....                              | 37        |
| 2.5.1. El sistema del complemento.....                                    | 37        |
| 2.5.2. Fagocitosis y receptores celulares.....                            | 38        |
| <b>3. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOFILMS BACTERIANOS .....</b>               | <b>39</b> |
| 3.1. Características de los biofilms.....                                 | 39        |
| 3.1.1. Formación de un biofilm .....                                      | 41        |
| 3.2. Biofilms de <i>S. pneumoniae</i> .....                               | 43        |
| 3.2.1. Regulación del biofilm neumocócico.....                            | 43        |
| 3.2.2. Importancia del CPS en el biofilm neumocócico.....                 | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.3. Matriz extracelular del biofilm neumocócico .....  | 46        |
| <b>3.3. Biofilms de <i>S. aureus</i></b> .....  | <b>47</b> |
| 3.3.1. Regulación del biofilm de <i>S. aureus</i> .....   | 47        |
| 3.3.2. Matriz extracelular del biofilm estafilocócico .....   | 49        |
| <b>3.4. Biofilms mixtos</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>3.5. Terapias antibiofilm</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>3.6. Los biofilms en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el humo de tabaco</b> .....   | <b>53</b> |
| <br>  |           |
| <b>II. OBJETIVOS</b> .....  | <b>55</b> |
| <br>  |           |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>59</b> |
| <br>  |           |
| <b>1. ESTIRPES BACTERIANAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVOS</b> .....  | <b>65</b> |
| 2.1. Estudios de susceptibilidad antibiótica .....  | 66        |
| <b>3. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS</b> .....   | <b>67</b> |
| 3.1. Obtención de sueros humanos .....  | 69        |
| 3.2. Obtención del extracto de humo de tabaco .....   | 69        |
| <b>4. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA</b> ....   | <b>70</b> |
| <b>5. TÉCNICAS DE ADN</b> .....   | <b>70</b> |
| 5.1. Preparación de ADN cromosómico .....   | 70        |
| 5.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....  | 71        |
| 5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación .....  | 72        |
| 5.4. Secuenciación masiva: preparación de librerías, secuenciación y ensamblaje .....   | 72        |
| <b>6. BIOFILMS</b> .....  | <b>73</b> |
| 6.1. Biofilms de <i>S. pneumoniae</i> .....   | 73        |
| 6.1.1. Inhibición y disgregación del biofilm de <i>S. pneumoniae</i> .....  | 74        |
| 6.2. Biofilms de <i>S. aureus</i> .....   | 74        |
| 6.1.1. Inhibición y disgregación del biofilm de <i>S. aureus</i> .....  | 75        |
| 6.3. Biofilms mixtos de <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> .....   | 76        |
| 6.4. Microscopía de barrido láser confocal .....  | 76        |
| <b>7. ENSAYOS DE DEPOSICIÓN DEL COMPONENTE C3</b> .....   | <b>77</b> |
| <b>8. OPSONOFAGOCITOSIS</b> .....   | <b>77</b> |
| 8.1. Opsonofagocitosis de cultivos planctónicos de <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i> .....  | 78        |
| 8.2. Opsonofagocitosis de biofilms de <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i> .....   | 78        |
| 8.3. Fagocitosis mediada por el receptor PSGL-1 .....   | 79        |
| 8.4. Opsonofagocitosis de biofilms de <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> y biofilms mixtos <i>S. aureus</i> – <i>S. pneumoniae</i> con sueros pre y post VCN13 ..... | 80        |
| <b>9. MODELOS ANIMALES</b> .....  | <b>81</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>   | <b>81</b>  |
| <b>IV. RESULTADOS.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>1. RELEVANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LOS SEROTIPOS 22F Y 33F INCLUIDOS EN LAS NUEVAS VACUNAS NEUMOCÓCICAS CONJUGADAS .....</b>                                 | <b>85</b>  |
| 1.1. Evolución de la enfermedad neumocócica invasiva producida por los serotipos 22F y 33F en España en el periodo 2009–2021: impacto del SARS-CoV-2 .....            | 85         |
| 1.2. Análisis genético de los clones circulantes de los serotipos 22F y 33F .....   | 95         |
| 1.3. Caracterización del biofilm de aislados circulantes de los serotipos 22F y 33F .....   | 97         |
| 1.4. Mecanismos de patogenidad de aislados clínicos pediátricos y adultos de los serotipos 22F y 33F .....  | 102        |
| 1.5. Interacción del sistema inmune frente a nuevos serotipos vacunales .....   | 110        |
| <b>2. EVOLUCIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CEFDITOREN Y OTROS ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE <i>S. PNEUMONIAE</i> EN ESPAÑA DURANTE EL PERIODO 2004–2020 .....</b> | <b>115</b> |
| <b>3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DE <i>S. AUREUS</i> SUSCEPTIBLE/RESISTENTE A METICILINA .....</b>   | <b>126</b> |
| 3.1. <i>S. aureus</i> en España .....   | 126        |
| 3.2. Caracterización del biofilm de aislados clínicos SASM y SARM .....   | 128        |
| 3.3. Caracterización de la matriz de los biofilms de aislados clínicos de <i>S. aureus</i> .....  | 134        |
| 3.4. Evolución del biofilm de aislados clínicos de <i>S. aureus</i> .....   | 143        |
| 3.5. Evasión del sistema inmune en <i>S. aureus</i> .....   | 155        |
| <b>4. BIOFILMS MIXTOS DE <i>S. AUREUS</i> Y <i>S. PNEUMONIAE</i> .....</b>  | <b>160</b> |
| 4.1. Desarrollo de un biofilm mixto de <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> .....  | 160        |
| 4.2. Terapias frente a biofilms mixtos de <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> .....   | 168        |
| 4.2.1. Los efectos bactericidas de NAC y Cys en los biofilms mixtos SASM-Sp y SARM-Sp.....  | 168        |
| 4.2.1. Efecto bactericida de los enzibióticos Cpl-711 y CHAPk en los biofilms mixtos SASM-Sp y SARM-Sp.....   | 175        |
| 4.2.3. Los efectos bactericidas del enzibiótico de tercera generación ChiDENPs-711.....   | 179        |
| <b>5. EFECTO DEL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO EN BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i> Y BIOFILMS MIXTOS DE <i>S. AUREUS</i>–<i>S. PNEUMONIAE</i>.....</b>                       | <b>183</b> |
| 5.1. Efecto del EHT en biofilms de <i>S. aureus</i> .....   | 183        |
| 5.2. Efecto del EHT en biofilms mixtos de <i>S. aureus</i> – <i>S. pneumoniae</i> .....   | 194        |
| <b>6. EFECTO DE LA VACUNA CONJUGADA NEUMOCÓCICA 13-VALENTE EN LA COLONIZACIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> Y <i>S. AUREUS</i> .....</b>                                    | <b>202</b> |
| 6.1. Estudio de la evasión del sistema inmune por biofilms de serotipos vacunales de neumococo incluidos en la VCN13 .....  | 202        |
| 6.2. Evaluación de sueros de pacientes con tratamientos de metotrexato y rituximab vacunados con VCN13 y PPV23 .....  | 206        |
| 6.3. Impacto de la vacunación con la VCN13 en la colonización de <i>S. aureus</i> .....   | 207        |
| <b>V. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>211</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 1. RELEVANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LOS SEROTIPOS 22F Y 33F INCLUIDOS EN LAS NUEVAS VACUNAS NEUMOCÓCICAS CONJUGADAS .....                                 | 213 |
| 2. EVOLUCIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CEFDITOREN Y OTROS ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE <i>S. PNEUMONIAE</i> EN ESPAÑA DURANTE EL PERIODO 2004–2020 ..... | 221 |
| 3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DE <i>S. AUREUS</i> SUSCEPTIBLE/RESISTENTE A METICILINA .....   | 225 |
| 4. BIOFILMS MIXTOS DE <i>S. AUREUS</i> Y <i>S. PNEUMONIAE</i> .....  | 235 |
| 5. EFECTO DEL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO EN BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i> Y BIOFILMS MIXTOS DE <i>S. AUREUS</i> – <i>S. PNEUMONIAE</i> .....                    | 245 |
| 6. EFECTO DE LA VACUNA CONJUGADA NEUMOCÓCICA 13-VALENTE EN LA COLONIZACIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> Y <i>S. AUREUS</i> .....                                    | 250 |
| <br>   |     |
| VI. CONCLUSIONES .....   | 255 |
| <br>   |     |
| VII. BIBLIOGRAFÍA .....  | 259 |
| <br>   |     |
| ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS.....   | 305 |





## ***Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*: enfermedad invasiva, biofilm y terapia**

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es el principal responsable de neumonía bacteriana adquirida en comunidad. Su principal factor de virulencia es el polisacárido capsular (CPS), dividiéndolo en, al menos, 101 serotipos. Entre un 5–10% de adultos y un 20–40% de niños, están colonizados por este patógeno, siendo este estado de portador en la nasofaringe, un prerrequisito para la posterior diseminación a vías estériles y producir enfermedad neumocócica invasiva (ENI). La ENI es prevenible por vacunación, en la actualidad se usan en España dos vacunas: la vacuna conjugada 13-valente (VCN13) y la vacuna polisacarídica 23-valente (VPN23). Desde la introducción de las vacunas conjugadas se ha observado un fenómeno denominado reemplazo de serotipos.

*Staphylococcus aureus*, es otro patógeno relevante responsable de un rango amplio de infecciones, desde menos graves como la foliculitis hasta infecciones invasivas graves como la endocarditis. *S. aureus* posee un gran arsenal de factores de virulencia como el CPS, presente en más del 90% de los aislados clínicos. Su principal relevancia clínica reside en su resistencia a antibióticos, especialmente *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). *S. aureus* coloniza hasta el 80% de individuos.

La mayoría de las bacterias pueden formar biofilms. El biofilm neumocócico se asocia al estado portador y a enfermedades infecciosas crónicas como otitis media y sinusitis. El biofilm de *S. aureus* también se encuentra extendido en clínica, produciendo infecciones asociadas a dispositivos médicos invasivos y mostrando una regulación compleja y multifactorial. Los biofilms estafilocócicos se pueden dividir según su matriz extracelular: biofilms de matriz polisacarídica (*ica*-dependientes) o biofilms de matriz extracelular rica en proteínas y ADN extracelular (*ica*-independientes). En infecciones asociadas a biofilms, estos suelen estar integrados por varias especies, por lo que biofilms mixtos de patógenos como *S. aureus* y *S. pneumoniae* son habituales en clínica, por ejemplo, en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), producida a consecuencia del tabaquismo.

En esta Memoria, se ha evaluado la epidemiología de los serotipos 22F y 33F causantes de ENI en España. La incidencia por los serotipos 22F y 33F ha aumentado

desde la introducción de la VCN13, sobre todo en la población adulta  $\geq 65$  años. Desde la pandemia por el virus SARS-CoV-2 (2020) ha ocurrido una caída drástica en el número de casos y la incidencia de ambos serotipos. Los clones circulantes predominantes fueron el ST433<sup>22F</sup> y el ST717<sup>33F</sup>. La caracterización del biofilm de aislados clínicos de ambos serotipos mostró que los aislados clínicos pediátricos forman mayor biofilm que los aislados clínicos adultos. Se observó una mayor evasión del sistema inmune en los biofilms del serotipo 22F. Además, se evaluó la susceptibilidad en aislados clínicos de *S. pneumoniae* no sensibles a penicilina a diferentes antibióticos durante el periodo 2004-2020. El cefditoren mostró ser una buena elección como cefalosporina oral para el tratamiento de infecciones por *S. pneumoniae*. Por último, se observó que desde la introducción de la VCN13 se está produciendo un aumento de aislados clínicos de *S. pneumoniae* no susceptibles a antibióticos que pertenecen a serotipos no vacunales.

Se caracterizó la formación de biofilm de aislados clínicos de *S. aureus* que poseen distintas toxinas y no se observó una relación entre factores de virulencia y formación de biofilm. Los aislados con toxina exfoliativa A mostraban un patrón de biofilm bimodal de buenas formadoras de biofilm y malas formadoras de biofilm. Al analizar la matriz de estos aislados se observó una diferencia notable en la biomasa según el tiempo de incubación del biofilm. Por ello, se estudió la evolución de los biofilms durante 28 h observándose que las cepas malas formadoras de biofilm mostraban una evolución irregular, formando buen biofilm a las 16 y 23 h y un mal biofilm a las 19 y 24 h. Por último, se confirmó que el biofilm de *S. aureus* evade mejor la opsonofagocitosis que un cultivo planctónico de manera independiente del sistema del complemento. El receptor de leucocitos PSGL-1 no reconoce específicamente a *S. aureus*.

Se desarrolló dos biofilms mixtos *in vitro* de *S. aureus* y *S. pneumoniae* utilizando una cepa de *S. pneumoniae* del serotipo 19A y una cepa SASM o SARM. *S. pneumoniae* necesita una ventaja en el inóculo y en el cultivo planctónico para alcanzar una población similar a la de *S. aureus* en el biofilm mixto. Los modelos se utilizaron para probar nuevas terapias antibiofilm con la cisteamina (Cys) y la *N*-acetil-L-cisteína (NAC). Cys fue un candidato ideal para la prevención y NAC para el tratamiento de los biofilms mixtos.

Se evaluó el efecto del extracto de humo de tabaco (EHT) en biofilms de *S. aureus* y en biofilms mixtos *S. aureus*-*S. pneumoniae*. Los resultados mostraron que el EHT incrementa la formación de biofilm de *S. aureus*, teniendo mayor efecto en aislados clínicos malos formadores de biofilm a las 24 h. En los biofilms mixtos, el EHT también aumentó la viabilidad de ambas poblaciones integrantes del biofilm.

El último objetivo fue evaluar el impacto de la VCN13 en los biofilms de serotipos vacunales y no vacunales de *S. pneumoniae* y en *S. aureus*. Se observó protección en los sueros de pacientes vacunados frente a biofilms de los serotipos 3, 18C, 19F y 19A, pero no frente al biofilm del serotipo vacunal 14. En pacientes sometidos a tratamientos biológicos sólo se encontró protección frente al biofilm del serotipo 19F. Por último, se confirmó que la vacunación no tenía ningún efecto frente a biofilms de *S. aureus*.

Como conclusiones de esta Memoria, la vigilancia epidemiológica tanto de los serotipos emergentes de *S. pneumoniae* como de la resistencia a antibióticos es necesaria. Los biofilms de *S. aureus* presentan evoluciones irregulares en su desarrollo. La Cys y la NAC son buenos candidatos como terapia frente a biofilms mixtos *S. aureus*-*S. pneumoniae*. El EHT induce aumento de la viabilidad y biomasa del biofilm. La VCN13 protege frente al estado portador de serotipos vacunales de neumococo y no tiene efecto sobre biofilms de *S. aureus*.



***Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: invasive disease, biofilm and therapy**

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is the main responsible of bacterial community-acquired pneumonia. Its main virulence factor is the capsular polysaccharide (CPS), which classifies the pneumococcus in at least 101 different serotypes. Between 5-10% of adults and up to 40% of children are colonized asymptotically, being the carrier state a requirement for the development of invasive pneumococcal disease (IPD). IPD is vaccine-preventable, there are two vaccines used in Spain: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) for children and adults and the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) for adults. Since the introduction of conjugate vaccines, non-vaccine serotypes have emerged, a phenomenon called serotype replacement.

*Staphylococcus aureus*, also a relevant pathogen, is responsible for a wide range of diseases: from less severe such as folliculitis to severe invasive diseases like endocarditis. *S. aureus* has an arsenal of virulence factors to evade the immune system including a CPS, present in up to 90% of clinical isolates. The main clinical relevance of *S. aureus* remains in its great clinical impact due to the antibiotic resistance, specifically caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains. *S. aureus* colonizes up to 80% of the population.

Most bacteria can form biofilms. Pneumococcal biofilm is associated with the carrier state and chronic infections such as otitis media and sinusitis. *S. aureus* biofilm is also relevant in clinical practice, as it is associated with infections on indwelling medical devices. Staphylococcal biofilms can be divided into two categories depending on the composition of the extracellular matrix: biofilms with polysaccharide matrix (*ica*-dependent) or biofilms with a protein and extracellular DNA matrix (*ica*-independent). We usually find mixed biofilms causing infections, and mixed biofilms by pathogens such as *S. aureus* and *S. pneumoniae* are worrisome in clinical practice. For example, mixed biofilms can be implicated in chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), one of the consequences of tobacco consumption.

In the present Thesis, we have evaluated the epidemiology of IPD caused by serotypes 22F and 33F in Spain. Since the introduction of PCV13, the incidence by serotypes 22F and 33F has increased, especially in adults  $\geq 65$  years old. But SARS-CoV-2 (2020) pandemic has produced a drastic drop in cases and incidence by both serotypes. The main circulating clones were ST433<sup>22F</sup> and ST717<sup>33F</sup>. We characterized the biofilm of clinical isolates of both serotypes, observing that pediatric isolates formed greater biofilm than adult isolates. We also observed a better immune evasion by serotype 22F. Moreover, we evaluated the evolution of non-susceptible to penicillin pneumococcal clinical isolates to different antibiotics, including oral cephalosporins, during the period 2004-2020. The oral cephalosporin cefditoren showed the best potential to treat infections by *S. pneumoniae*. Finally, since the introduction of PCV13, we have observed an increase of non-PVC13 isolates with reduced susceptibility to antibiotics.

We characterized the biofilm formation of several clinical isolates expressing different toxins to study a potential moonlighting effect (extracellular matrix stabilization by alkaline virulence factor). We did not observe a clear relationship between virulence factors and biofilm formation. Exfoliative toxin A positive clinical isolates showed a bimodal pattern of good/bad biofilm. When we analyzed the composition of their extracellular matrix, we observed a remarkable difference in biofilm formation between incubations. Thus, we examined biofilm formation during a 28 h period and we observed that bad biofilm former strains showed irregular patterns, with periods of bad biofilm formation (20 and 24 h) and periods of good biofilm formation (16 and 23 h). Finally, we confirmed that the evasion of the opsonophagocytosis by *S. aureus* biofilms was complement-independent. Moreover, we found that the PSGL-1 receptor did not recognize *S. aureus*.

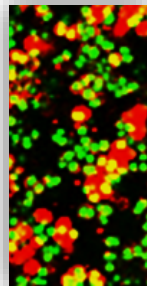
We developed two *in vitro* *S. aureus* and *S. pneumoniae* mixed biofilms using a serotype 19A *S. pneumoniae* strain and a MSSA or MRSA strain. In the mixed biofilm, *S. pneumoniae* needs an advantage in the inoculum and the planktonic culture to reach a similar population as *S. aureus*. We used both models to test new antibiofilm therapies by cysteamine (Cys) and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC). Cys is an ideal candidate for prevention and NAC for the treatment of mixed biofilms.

We evaluated the effect of tobacco smoke extract (TSE) on *S. aureus* biofilms and *S. aureus*–*S. pneumoniae* mixed biofilms. TSE increased biofilm formation in *S. aureus*, having a greater effect in bad biofilm former strains at 24 h. In mixed biofilms, TSE increased the viability of both populations within the biofilm.

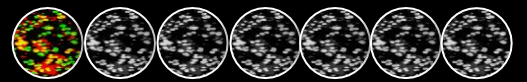
The last objective of the present Ph.D. thesis was to evaluate the impact of PCV13 in biofilms of different *S. pneumoniae* vaccine and non-vaccine serotypes and in *S. aureus*. We observed protection in vaccinated patients against biofilms of serotypes 3, 18C, 19F, and 19A, but we did not observe protection against the vaccine serotype 14. Vaccinated patients with biological therapies only showed protection against serotype 19F biofilm. Finally, vaccination with PCV13 did not have any effect against *S. aureus*.

In conclusion, epidemiological surveillance of *S. pneumoniae* emergent serotypes and antibiotic resistance is necessary. *S. aureus* biofilms showed irregular patterns during biofilm formation. Cys and NAC are good therapeutical candidates against *S. aureus*–*S. pneumoniae* mixed biofilms. TSE increases viability and biomass within the biofilms. Finally, PCV13 protects against the carrier state of certain vaccine serotypes and does not have any effect on *S. aureus* biofilms.





# I. INTRODUCCIÓN





## 1. *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: CARACTERÍSTICAS Y PATOGÉNESIS

### 1.1. Aspectos históricos

*Streptococcus pneumoniae*, conocido como neumococo, es una bacteria que fue descubierta de manera simultánea por Sternberg y Pasteur en 1880, aunque Pasteur (Pasteur, 1881) hizo públicas sus observaciones antes que Sternberg (Sternberg, 1881). En 1884, Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre para facilitar la visualización de neumococo en el tejido pulmonar, categorizándolo como Gram-positivo (Gram, 1884). Ese mismo año se denominó a la bacteria como *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884), más tarde como *Diplococcus pneumoniae* debido a los pares de cocos que formaba el patógeno (Weichselbaum, 1886) y, finalmente en 1901, *S. pneumoniae* (Chester, 1909), aunque no fue oficialmente aceptada hasta 1980 (Skerman *et al.*, 1980).

Neumococo ha desempeñado un papel fundamental en el nacimiento de la biología molecular. Los estudios de Griffith que dieron evidencia de la transformación genética bacteriana fueron realizados con *S. pneumoniae*. Griffith demostró que cuando se inoculaba en un ratón una mezcla de células capsuladas muertas por calor junto a células no capsuladas vivas (que no eran virulentas) se producía una infección letal y las bacterias recuperadas presentaban un tipo capsulado (Griffith, 1928). A la sustancia que causaba este cambio lo denominó “principio transformante”, que fue posteriormente identificado como el ADN (Avery *et al.*, 1944). A su vez, Klemper y Klemper, demostraron que el suero de conejos inoculados con la bacteria muerta por calor o con filtrado del medio de cultivo confería inmunidad frente a una infección por el mismo aislado, pero no necesariamente frente a infecciones por otros aislados clínicos. Además, esto demostraba que los sueros de conejos previamente inmunizados protegían a los conejos de la infección por neumococo (Austrian, 1981). En los años 20 del siglo XX se demostró que el polisacárido capsular (CPS) era el responsable de la actividad inmunológica descrita frente a neumococo, convirtiéndose en el primer antígeno no proteico identificado (Heidelberger y Avery, 1923, Heidelberger y Avery, 1924, Heidelberger *et al.*, 1925).

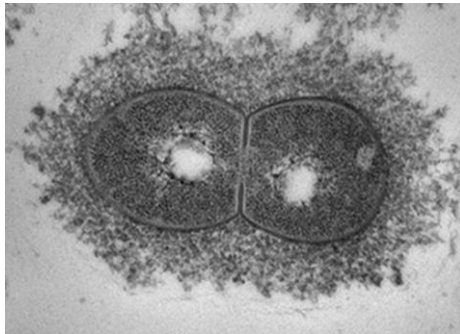
## 1.2. Características generales

*S. pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva, de 0.5–1.25  $\mu\text{m}$  de longitud con una forma oval, siendo los extremos distales lanceolados. Generalmente encontramos a este microorganismo formando parejas (diplococos) o cadenas cortas. Es inmóvil y no forma endosporas. Está considerado un miembro  $\alpha$ -hemolítico del género *Streptococcus*, ya que al ser cultivado en placas de agar sangre en aerobiosis presenta una marcada  $\alpha$ -hemólisis debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Barnard y Stinson, 1996), pero al ser incubado en anaerobiosis, se observa una  $\beta$ -hemólisis debido a la acción de la neumolisina (Ply) (Brzin, 1969). Además, es una bacteria ácido-láctica, anaerobia facultativa, catalasa-negativa y sensible a las sales biliares como el desoxicolato sódico (DOC). La sensibilidad a sales biliares se debe principalmente a que disparan la acción de la principal autolisina del neumococo, LytA, que degrada la pared en un proceso dependiente de colina (Mosser y Tomasz, 1970). *S. pneumoniae* es auxótrofo de colina, siendo este aminoalcohol imprescindible para el crecimiento de este microorganismo (Tomasz, 1967) y, en forma de fosforilcolina (P-Cho), un componente estructural de los ácidos teicoicos (TAs) y lipoteicoicos (LTAs) de la pared celular (Brundish y Baddiley, 1968, Fischer *et al.*, 1993). Otra característica, a parte de la lisis en presencia de DOC, que nos sirve para identificar aislados clínicos de neumococo es su sensibilidad a optoquina (Opt) (Lund y Henrichsen, 1978). Esta sensibilidad a la optoquina, un derivado de la quinina, se debe a que es un inhibidor específico de proteínas presentes en la subunidad  $F_0$  de la ATPasa próton-motriz ( $H^+$ -ATPasa) de neumococo (Fenoll *et al.*, 1994). Sin embargo, se han encontrado aislados de neumococo que son Opt-resistentes (de la Campa *et al.*, 1997) y estreptococos filogenéticamente próximos a neumococo (estreptococos del grupo mitis como *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus infantis*) que son Opt-sensibles (Martín-Galiano *et al.*, 2003, Balsalobre *et al.*, 2006). Sobre la base de lo anterior, es recomendable utilizar la sensibilidad a Opt junto a la lisis en presencia de DOC para poder realizar un diagnóstico correcto.

Neumococo es un patógeno humano aunque, de forma excepcional, se hayan aislado neumococos a partir de animales de compañía y otros que habían estado previamente en contacto con humanos (van der Linden *et al.*, 2009).

### 1.2.1. Polisacárido capsular, genes capsulares y tipificación

Una de las principales características de *S. pneumoniae* es su cápsula (**Figura 1**), siendo su principal factor de virulencia ya que bloquea el reconocimiento del microorganismo por parte del hospedador impidiendo así la fagocitosis (Llull *et al.*, 2001b, Hyams *et al.*, 2010a, Geno *et al.*, 2015). El CPS es la estructura más externa y está formada por polisacáridos complejos basados en unidades repetidas de azúcares. Este se encuentra unido de manera covalente a azúcares de la pared celular (Larson y Yother, 2017), lo cual dificulta el análisis del CPS ya que se requiere de manera pura para poder analizar su estructura (Sørensen *et al.*, 1990). Estas unidades repetidas de azúcares suelen tener de dos a diez residuos y a menudo sustituciones de O-acetil, fosfoglicerol y piruvyl acetal en diferentes sitios/ratios (Calix *et al.*, 2012). En la actualidad se han descrito hasta 101 serotipos capsulares (Ganaie *et al.*, 2020, Pimenta *et al.*, 2021), divididos en 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (no se utilizaron los números 26 y 30), de los cuáles algunos incluyen un único serotipo (como el 1 y el 3) y otros hasta 7 (como el serogrupo 6). Tradicionalmente el primer serotipo de un serogrupo se ha descrito con la letra F (por *first*) (Lund, 1970). La mayoría de CPS son aniónicos, por lo que la mayoría de aislados clínicos tienen carga negativa, que ayuda a neumococo a que no sean eliminados por el mucus, además de repeler por cargas electrostáticas la fagocitosis (Nelson *et al.*, 2007, Geno *et al.*, 2015). Hay varias excepciones, entre ellas los serotipos 7A, 7F, 14, 33F, 33A y 37 que no están cargados (Kamerling, 1999, Lin *et al.*, 2013)



**Figura 1.** Imagen al microscopio electrónico de transmisión de una cepa capsulada del serotipo 19F de neumococo. Se observa el diplococo y la cápsula polisacáridica que rodea a las células. Reproducido de Amerighi *et al.*, 2016.

El locus responsable de la síntesis del CPS es el locus *cap* o *cps*, que se encuentra situado entre los genes *dexB* y *aliA* (sin ningún tipo de relación con la síntesis del CPS) a excepción del serotipo 37, cuya síntesis de CPS depende de una única proteína codificada por el gen *tts* situado lejos del locus *cap* (Llull *et al.*, 2001a, Bentley *et al.*, 2006, Moscoso y García, 2009). La mayoría de serotipos, a excepción de los serotipos 3 y 37, sintetizan su CPS mediante un mecanismo polimerasa-dependiente (Wzy), en la cual las subunidades repetidas se unen individualmente a undecaprenil fosfato en la cara interna de la membrana (Arrecubieta *et al.*, 1996, Llull *et al.*, 2001a). Por otro lado, en los serotipo 3 y 37 son glicosiltransferasa-(sintasa)-dependientes y las secuencias comunes que codifican proteínas con función reguladora no están presentes (serotipo 37) (Llull *et al.*, 2001a) o están mutadas (serotipo 3) (Arrecubieta *et al.*, 1996). La regulación de la cápsula es compleja, de manera que hay fenómenos de transformación y recombinación en los cuáles los genes que codifican para un tipo de cápsula son intercambiados; este suceso denominado *capsular switching* es importante porque puede dar lugar a fenómenos de escape a las vacunas (Brueggemann *et al.*, 2007).

La tipificación de neumococo se ha basado tradicionalmente en la serotipificación mediante la reacción capsular, llamada *Quellung* (Neufeld, 1902), utilizando anticuerpos contra el CPS obtenidos en conejos mediante inoculación de células tratadas con formaldehído (Mørch, 1942). Otras técnicas de reacción capsular se han desarrollado posteriormente para simplificar el procedimiento (Fenoll *et al.*, 1997, Marimon *et al.*, 2010). La necesidad de identificar diferentes aislados del mismo serotipo que mostraban diferentes patrones de resistencia a antibióticos hizo que se desarrollasen técnicas moleculares como la electroforesis de ADN genómico de campo pulsante (PFGE) (Gasc *et al.*, 1991, Lefevre *et al.*, 1993) y, posteriormente, la técnica de secuenciación multilocus (MLST, *Multilocus Sequence Typing*) (Enright y Spratt, 1999). La técnica MLST, es junto a la reacción capsular, la técnica más usada hoy en día para la tipificación de neumococo. Se basa en los mismos principios que la electroforesis enzimática multilocus (MLEE) (Selander *et al.*, 1986, Hall *et al.*, 1996) pero, el MLST, utiliza la comparación de secuencias parciales de siete genes muy conservados (*housekeeping*) que definen el denominado secuencitipo (ST), en lugar de la movilidad electroforética de sus productos respectivos. Esto permite una comparación sencilla gracias a una base de datos que se ha creado en internet (Enright

y Spratt, 1998, Jolley *et al.*, 2018). Además, existen programas que permiten agrupar los diferentes STs en complejos clonales (CC), que son el conjunto de STs idénticos y los que difieren entre sí con al menos un miembro del grupo en sólo uno de los siete genes (Feil *et al.*, 2004). Los siete genes usados en el MLST de neumococo son: *aroE* (siquimato deshidrogenasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gki* (glucoquinasa), *recP* (transcetolasa), *spi* (peptidasa señal I), *xpt* (xantina fosforribosil-transferasa) y *ddl* (D-alanina-D-alanina ligasa). A partir del MLST se desarrolló posteriormente el análisis mediante secuenciación multilocus (MLSA, *Multilocus Sequence Analysis*), que utiliza genes diferentes a los de la MLST para identificar especies de estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos, *viridans*, que están relacionados con *S. pneumoniae* y que son difíciles de diferenciar por otros métodos (Hanage *et al.*, 2006, Bishop *et al.*, 2009)

### 1.2.2. Proteínas de unión a colina o CBPs

Las proteínas de unión a colina (CBPs) se pueden encontrar en todas las cepas de neumococo, localizadas en la superficie celular (Maestro y Sanz, 2016). Estas proteínas se basan en la suma de dos dominios diferentes: un dominio funcional y un dominio de unión a colina (CBD) conservado. El dominio funcional es el responsable de la actividad biológica de la proteína mientras que el CBD permite a las proteínas la unión no-covalente a los residuos de P-Cho de los TAs y LTAs de la pared celular del neumococo (García *et al.*, 1990). A excepción de las mureín hidrolasas LytB y LytC, el módulo de unión a colina se encuentra en el C-terminal que, en el caso de PspA y PspC, está precedido por una región rica en prolina (Brooks-Walter *et al.*, 1999). El número de CBPs en neumococo es cepa-dependiente, pero suele haber entre 13 y 16 CBPs por cepa (Maestro y Sanz, 2016). Muchas de las CBPs se pueden encontrar en otras especies comensales cercanas a neumococo con residuos de P-Cho en su pared celular como *S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* y *S. oralis* (Moscoso *et al.*, 2005, Lull *et al.*, 2006, Reichmann *et al.*, 2011). También se pueden encontrar en otras especies bacterianas más alejadas filogenéticamente de neumococo como *Clostridium beijerinckii* (García *et al.*, 1988, Podvin *et al.*, 1988, Sánchez-Beato y García, 1996), *Clostridiodes difficile* (Demarest *et al.*, 2005, Ho *et al.*, 2005) y *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Makino *et al.*, 2000, To y Nagai, 2007, da Silva *et al.*, 2008, Ogawa *et al.*, 2011)

Algunas CBPs, como LytA, LytB, LytC, Pce y CbpD, están implicadas en la hidrólisis de diferentes enlaces covalentes de la pared celular de *S. pneumoniae*. La principal hidrolasa de la pared celular, *N*-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa o LytA, es la principal enzima autolítica de neumococo. LytA produce la lisis de la pared celular de neumococo, liberando la citotoxina Ply y mediadores inflamatorios como los TAs y fragmentos de peptidoglicano (Canvin *et al.*, 1995). Se han descrito dos familias de alelos del gen *lytA*, pero estos polimorfismos no afectan a la estructura primaria de la proteína ya que se conservan todos los aminoácidos (Morales *et al.*, 2010). Otra de las hidrolasas de la pared celular es LytB, una *N*-acetylglucosaminidasa la cual tiene un amplio espectro de funciones, como participar en la colonización de la nasofaringe (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011), es responsable de la separación celular después del ciclo celular (de Las Rivas *et al.*, 2002), tiene un papel activo y estructural en la formación y mantenimiento de los biofilms neumocócicos (Domenech y García, 2020) y también está implicada en la evasión del sistema inmune (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). A pesar de tener polimorfismos en las repeticiones del módulo de unión a colina, LytB es una proteína bien conservada (Moscoso *et al.*, 2005). La tercera hidrolasa de la pared celular es LytC, una enzima autolítica que rompe los residuos *N*-acetylmuramoyl-*N*-glucosaminyl del polisacárido de la pared celular (García *et al.*, 1999). La mayoría de aislados clínicos poseen el gen *lytC*, además de ser el gen de neumococo con más expresión en la nasofaringe humana (Sakai *et al.*, 2013). Entre las funciones de LytC destaca su papel en la colonización (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011), en la formación de biofilms (Moscoso *et al.*, 2006), su participación en el fenómeno conocido como fratricidio (Claverys y Håvarstein, 2007) y su habilidad para evadir el sistema inmune por diferentes mecanismos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). CbpF, una de las CBPs más abundantes en la pared celular de neumococo, no posee actividad catalítica pero funciona como regulador de LytC, interactuando con el peptidoglicano de la pared celular e impidiendo el acceso de LytC y otras lisozimas a este sustrato (Molina *et al.*, 2009). Pce es una esterasa de residuos P-Cho de los TAs y LTAs (Höltje y Tomasz, 1974, Vollmer y Tomasz, 2001, de las Rivas *et al.*, 2001). Su principal función es participar en la distribución y restructuración del contenido de colina en la pared celular; por lo tanto, Pce regula indirectamente la actividad de las otras CBPs (Hermoso *et al.*, 2005). Esta regulación de residuos de P-Cho hace también que el reconocimiento de la bacteria por la proteína C-reactiva (CRP) esté disminuido, por lo que el patógeno podrá evadir el sistema inmune (Kharat y Tomasz,

2006). Por último, está la CbpD, implicada en la división de *S. pneumoniae* y expresada durante la fase de competencia (Kausmally *et al.*, 2005). Esta proteína en cultivos líquidos participa en el fratricidio junto a LytA, LytC y CibAB (Guiral *et al.*, 2005).

Otra pareja de CBPs con alta importancia biológica son PspA y PspC. PspA es una de las CBPs más estudiadas, ya que prácticamente se encuentra en todos los aislados clínicos (Crain *et al.*, 1990, Hollingshead *et al.*, 2000). PspA es muy variable y se divide en dos grandes familias basadas en las diferencias de la región helicoidal situada antes de la región rica en prolina (Hollingshead *et al.*, 2000). Es esencial en la patogénesis de neumococo ya que interfiere con la activación del complemento, impidiendo la deposición de C3b, C5b (Tu *et al.*, 1999, Ren *et al.*, 2004b, Ren *et al.*, 2012) e inhibiendo la proteína C-reactiva (Mukerji *et al.*, 2012), y se une a lactoferrina protegiendo a neumococo del polipéptido (Hammerschmidt *et al.*, 1999, Jedrzejewski, 2006). PspC, al igual que PspA, tiene una gran variabilidad y, a nivel de alelos, se puede clasificar en 11 grupos diferentes (Brooks-Walter *et al.*, 1999, Du *et al.*, 2021). PspC participa en adhesión y colonización de la nasofaringe, en la colonización del pulmón y promueve la invasión (Rosenow *et al.*, 1997, Balachandran *et al.*, 2002). Además, evade el sistema inmune de diferentes maneras, mediante la unión al receptor polimérico de inmunoglobulinas (Hammerschmidt *et al.*, 1997, Kerr *et al.*, 2006) y a la evasión del complemento, reclutando a los reguladores negativos Factor H (fH) y C4BP (Janulczyk *et al.*, 2000, Dave *et al.*, 2001, Jarva *et al.*, 2002, Hammerschmidt *et al.*, 2007, van der Maten *et al.*, 2018) y evitando la lisis por el complejo terminal del complemento (TCC) mediante la unión a vitronectina (Voss *et al.*, 2013, Kohler *et al.*, 2015).

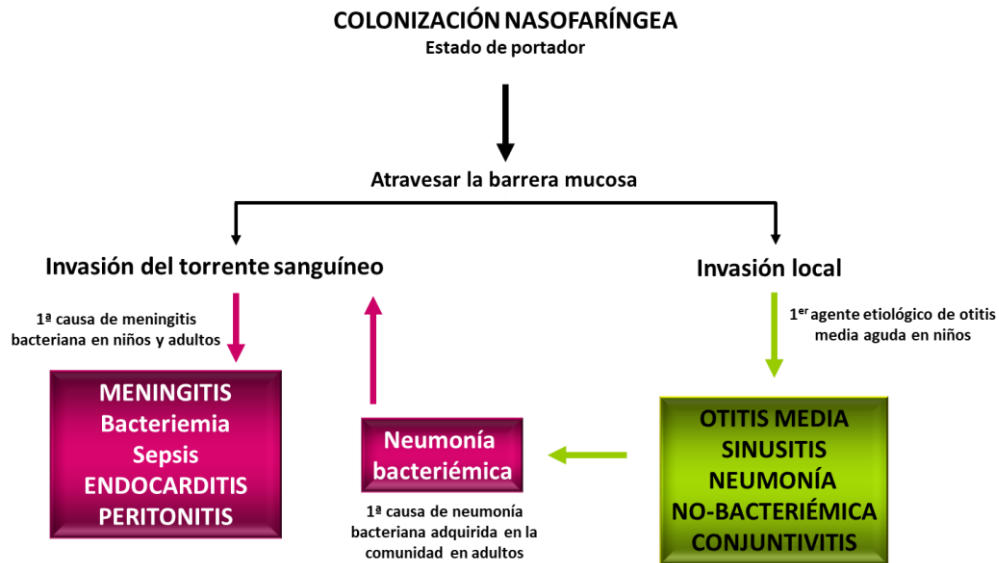
También cabe destacar las CBPs que principalmente tienen función como adhesinas. Un ejemplo de este grupo son la PcpA, que forma parte de la subfamilia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas en el N-terminal (LRRTP) (Glover *et al.*, 2008, Frolet *et al.*, 2010). PcpA, al igual que PspA, se encuentra en todos los aislados clínicos, y es importante para el establecimiento de la neumonía neumocócica (Sánchez-Beato *et al.*, 1998, Frolet *et al.*, 2010). En el caso de CbpG, su función dependerá de si está secretada, que se encargará de romper la matriz extracelular del hospedador, o unida a la superficie bacteriana, participando en la adhesión a la mucosa de la nasofaringe (Gosink *et al.*, 2000). También está CbpM, cuya función está menos estudiada, pero se demostró que podía unirse a fibronectina, participando

en la adhesión al epitelio de neumococo (Afshar *et al.*, 2016), además de supuestamente interactuar con la CRP (Frolet *et al.*, 2010). Por último, CbpI (Frolet *et al.*, 2010), CbpJ (Yamaguchi *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2019) y CbpL (Frolet *et al.*, 2010, Yamaguchi *et al.*, 2019) tienen funciones en adhesión y evasión inmune, mientras que CbpK tiene una función desconocida por ahora en la patogénesis de neumococo (Maestro y Sanz, 2016).

### 1.3. Importancia clínica

*S. pneumoniae* tiene una gran importancia por su gran capacidad para causar enfermedad en el ser humano. Esta bacteria se encuentra colonizando la nasofaringe de portadores sanos, principalmente de niños (entre el 20–40% de niños sanos) y ocasionalmente adultos (5–10%) (Loughran *et al.*, 2019). Esta colonización en el hospedador, el estado de portador, comienza poco después del nacimiento, donde neumococo establece una relación comensal asintomática (Kadioglu *et al.*, 2008). En algunas ocasiones, este equilibrio con el hospedador se rompe, por lo que el patógeno puede invadir nichos estériles y no estériles causando diferentes patologías (Weiser *et al.*, 2018). Las enfermedades infecciosas del tracto respiratorio inferior (EITRI) se asocian a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Antes de que apareciera el SARS-CoV-2, las EITRI eran la cuarta causa de mortalidad en el mundo con cerca de 2,38 millones de fallecimientos, siendo *S. pneumoniae* el principal agente etiológico de estas neumonías, afectando de forma mayoritaria a la población menor de 5 años y los adultos por encima de 60 (GBD, 2018). La colonización nasofaríngea es un prerrequisito para el establecimiento de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) y para el establecimiento de enfermedades no invasivas como neumonía no invasiva, otitis y sinusitis (Bogaert *et al.*, 2004). Manifestaciones clínicas más graves se dan cuando el neumococo alcanza zonas estériles como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR), donde produce enfermedades como neumonía invasiva, sepsis y meningitis (**Figura 2**). También puede producir enfermedades como miocarditis, pericarditis y artritis aguda (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013, Brown *et al.*, 2014, Shenoy *et al.*, 2017). La ENI puede causar muerte y, sobre todo en los casos de meningitis, está asociada a secuelas (Baraff *et al.*, 1993, Koedel *et al.*, 2002). En un meta-análisis global de meningitis bacterianas se observó que el principal agente etiológico era neumococo tanto en población pediátrica (de un 22.5

a un 44.1% de los casos) como en población adulta (de un 9.6 a un 75.5% de los casos) (Oordt-Speets *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Esquema de las diversas afecciones producidas por *S. pneumoniae*.

Uno de los principales factores de riesgo de sufrir ENI es la edad. La mayor prevalencia de neumococo en la población pediátrica se debe a la inmadurez de su sistema inmune, que produce una menor capacidad de responder a antígenos polisacáridicos. Además, la colonización y adquisición de nuevas cepas es mayor en esta edad (Hussain *et al.*, 2005). En el caso de la población adulta mayor de 65 años, se da el fenómeno de inmunosenescencia, defectos inmunes asociados a la edad, que contribuyen a la mayor carga de enfermedad en esta población (Krone *et al.*, 2014). Hay enfermedades de base que también suponen un mayor riesgo de padecer neumonía neumocócica y ENI, destacando las patologías crónicas cardiovasculares, diabetes mellitus, inmunodeficiencias, asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). También, ciertos hábitos de vida como el tabaquismo, aumentan el riesgo (Torres *et al.*, 2015). Por lo tanto, se puede observar la importancia del estado inmunológico del paciente a la hora de sufrir ENI o no; por ejemplo, los pacientes que sufren una primoinfección por el virus de la gripe pueden sufrir una sobreinfección por *S. pneumoniae* y una forma más grave de la enfermedad (MacIntyre *et al.*, 2018). Es importante destacar que, en la actualidad, la pandemia producida por el SARS-

CoV-2 causante de la COVID19, ha provocado un colapso en el sistema sanitario, económico y social mundial. Estudios recientes en pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos por neumonías producidas por SARS-CoV-2, demuestran que neumococo puede ser uno de los patógenos bacterianos que pueden producir coinfecciones con este virus, incrementando la severidad de la neumonía por SARS-CoV-2 (Contou *et al.*, 2020, Nieto-Moro *et al.*, 2020, Cucchiari *et al.*, 2020).

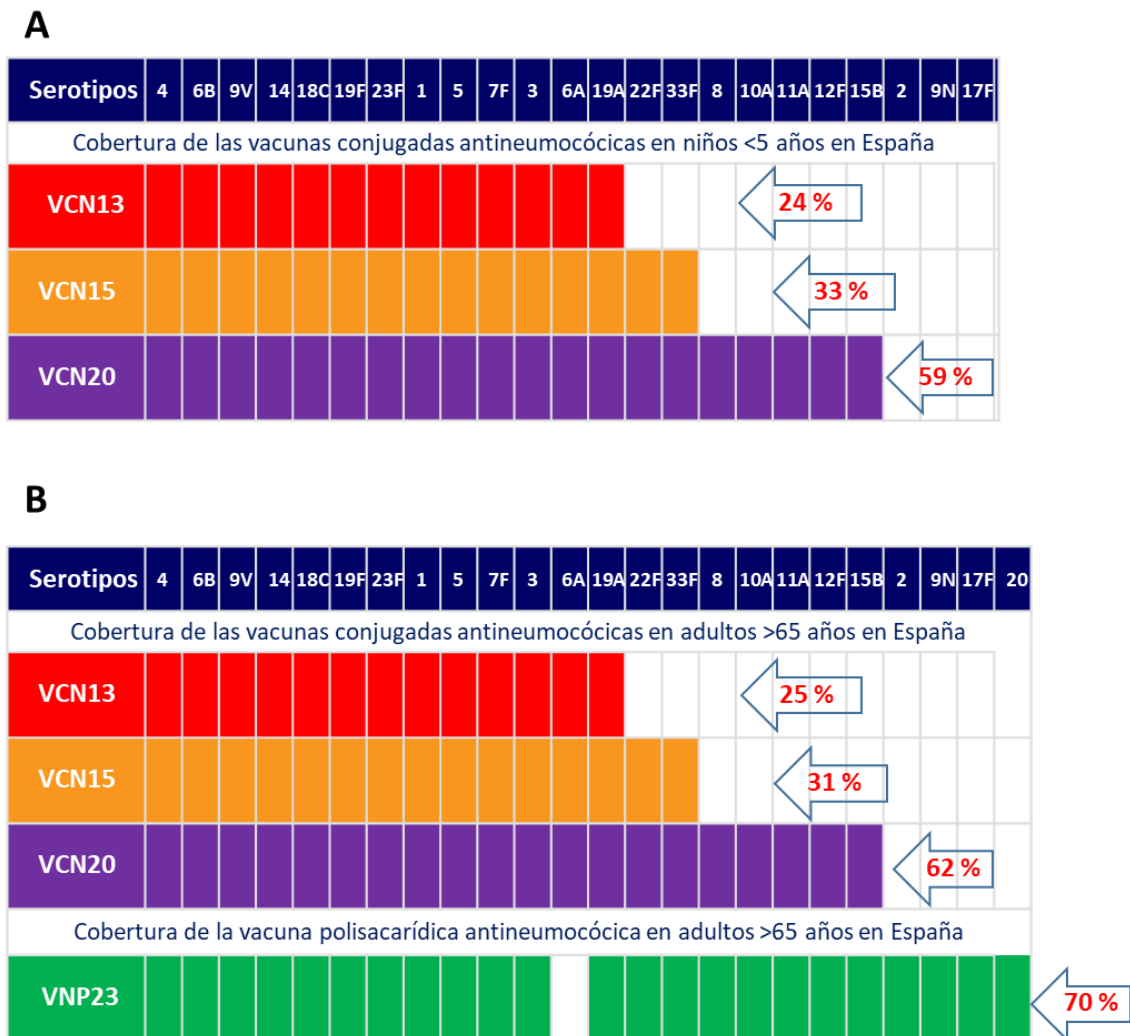
### 1.3.1. Vacunas frente a *S. pneumoniae*

La prevención de la ENI es esencial ya que, como se ha mencionado previamente, se trata de una de las principales causas de mortalidad dentro de las enfermedades infecciosas. En la actualidad existen dos tipos de vacunas frente a *S. pneumoniae* y ambas utilizan el principal factor de virulencia del neumococo, el CPS. Los primeros ensayos clínicos para encontrar una vacuna frente a la enfermedad neumocócica fueron utilizando una vacuna de célula entera en Sudáfrica en 1914 (Wright *et al.*, 1914, Moberley *et al.*, 2013). Posteriormente se decidió usar aproximaciones con polisacárido purificado, primero una vacuna neumocócica polisacáridica de cuatro serotipos (VNP4) (MacLeod *et al.*, 1945), luego se realizaron diferentes ensayos clínicos de una VNP6, una VNP13 y una VNP14 (Austrian, 1977, Riley *et al.*, 1977), esta última mostró una elevada eficacia frente a la neumonía bacteriémica. Estas vacunas contenían 50 µg del CPS de cada serotipo purificado. La VNP14 se licenció en Estados Unidos en 1977 pero, en 1983, se sustituyó por una formulación con 23 CPS, la VNP23, que contenía 25 µg de cada CPS (Moberley *et al.*, 2013).

La mencionada VNP23 contiene los polisacáridos capsulares de los 23 principales serotipos que causaban ENI en el momento de su desarrollo (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F Y 33F). Esta vacuna de contenido polisacáridico tiene una serie de limitaciones, ya que sólo está recomendada en población mayor de dos años y la respuesta inmune humoral que produce es independiente de linfocitos T. Por lo tanto, produce anticuerpos pero no una memoria inmunológica, disminuyendo su papel protector a lo largo del tiempo (Stein, 1992, Andrews *et al.*, 2012, Hayward *et al.*, 2016). La VNP23 tampoco evita el estado de portador asintomático y su capacidad de prevenir la neumonía neumocócica es limitada (Jackson *et al.*, 2003).

Debido a dichas limitaciones, en 2000 se comercializó la primera vacuna conjugada contra neumococo, la vacuna neumocócica conjugada 7-valente (VNC7), que solucionaba alguna de las limitaciones de la polisacáridica: podía ser suministrada desde los dos meses de edad y produce memoria inmunológica, siendo una vacuna eficaz y segura. En esta formulación al estar combinados los CPS con una proteína inmunogénica, el toxoide diftérico, podía producir una respuesta inmune dependiente de linfocitos T (Hayward *et al.*, 2016). La principal limitación de la VCN7 fue su número reducido de polisacáridos capsulares diferentes, ya que sólo cubría 7 serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Posteriormente, se han ido desarrollando vacunas conjugadas que incluyen hasta 10 y 13 serotipos, como son la VNC10 (cubre los serotipos de la VCN7 más los serotipos 1, 5 y 7F, utilizando, además, una proteína transportadora o *carrier* diferente a la VNC7/VNC13) y la VCN13, que es la más utilizada en la actualidad (cubre los serotipos de la VNC10 más los serotipos 3, 6A y 19A). Actualmente están muy próximas de ser autorizadas por las agencias reguladoras y comercializarse la VNC15 (cubrirá los serotipos de la VCN13 más los serotipos 22F y 33F) (Greenberg *et al.*, 2018, Stacey *et al.*, 2019) y la VNC20 (cubrirá los serotipos de la VCN13 más los serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, y 33F) (Thompson *et al.*, 2019, Hurley *et al.*, 2020) (**Figura 3**). Diferentes estudios han demostrado que la VCN13 no sólo tiene efecto frente a la ENI sino que también disminuye la neumonía neumocócica y el estado del portador, teniendo un efecto rebaño o de inmunidad indirecta en la población adulta (Bonten *et al.*, 2015, McLaughlin *et al.*, 2018).

Debido al limitado número de serotipos que puede cubrir una vacuna compuesta por polisacáridos y a fenómenos que explicaremos en el siguiente apartado, se están desarrollando otro tipo de aproximaciones a la vacunación por neumococo. Se estudia el uso de vacunas de célula completa, basadas en vacunas atenuadas vivas (Ramos-Sevillano *et al.*, 2020), vacunas atenuadas, extractos crudos (Moffitt *et al.*, 2012, Malley y Anderson, 2012, Xu *et al.*, 2014) o en sistemas acelulares (Zhang *et al.*, 2013). También hay ensayos clínicos de formulaciones usando proteínas candidatas a vacunas, en los que, en vez de usar una sola, se utilizan combinaciones de diferentes proteínas recombinantes para obtener un efecto complementario en la respuesta inmune (Briles *et al.*, 2000, Sempere *et al.*, 2021), además de evitar la heterogeneidad de las proteínas entre los diferentes aislados clínicos (Gámez *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Cobertura de las presentes y futuras vacunas antineumocócicas en niños < 5 años y adultos  $\geq$  65 años basadas en datos epidemiológicos de España de 2019 de Miguel *et al* 2020. **(A)** Cobertura de las vacunas VCN13, VCN15 y VCN20 en niños < 5 años. **(B)** Cobertura de las vacunas VCN13, VCN15, VCN20 y la VNP23 en adultos  $\geq$  65 años. Los porcentajes corresponden a los casos de ENI notificados en 2019 que cubrirían potencialmente las vacunas.

### 1.3.2. Impacto de las vacunas en la enfermedad neumocócica invasiva

Desde la introducción de las vacunas conjugadas la incidencia de la ENI por serotipos vacunales se ha visto reducida. Por ejemplo, desde la introducción de la VNC7 en 2001 en España (vacunando sólo a población pediátrica y sin estar financiada) disminuyó la incidencia por todos los serotipos vacunales tanto en población pediátrica como adulta, mostrando un efecto rebaño en la población adulta (Fenoll *et al.*, 2009, Fenoll *et al.*, 2015). Este mismo fenómeno se observó en otros países como Inglaterra (Ladhani *et al.*, 2013) y EE.UU. (Tan, 2012). El principal problema fue que, en la mayoría de países, se produjo el fenómeno denominado reemplazo de serotipos, que consiste en que la vacuna como sólo cubría 7 de los más de 92 serotipos descritos en esa época observaron que otros serotipos estaban ocupando el lugar que habían dejado aquellos que estaban incluidos en la vacuna, apreciando un aumento de portación y de incidencia de ENI por serotipos no vacunales (Fenoll *et al.*, 2009, Weinberger *et al.*, 2011, Fenoll *et al.*, 2015). El incremento de serotipos no-VNC7, sobre todo del 19A, hizo necesaria una vacuna conjugada que incluyese más serotipos. Desde la introducción de la VNC13, la incidencia de la ENI por serotipos vacunales VCN13 se ha reducido aún más (Waight *et al.*, 2015, Pilishvili *et al.*, 2017, Ladhani *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020, Oyewole *et al.*, 2021). Esta vacunación también se ha visto acompañada por un aumento de serotipos no vacunales pudiendo peligrar el efecto de las vacunas conjugadas (Savulescu *et al.*, 2017, Ladhani *et al.*, 2018, Richter *et al.*, 2019, Ouldali *et al.*, 2020), aunque en Estados Unidos los serotipos no-VCN13 se han mantenido estables. Esta diferencia se puede deber a las diferentes pautas de vacunación pediátrica entre los países, ya que EE.UU. usa una pauta 3+1 (primaria + *booster*) y, en España como en la mayoría de países europeos, se utiliza una pauta 2+1 (Lewnard y Hanage, 2019).

### 1.3.3. Resistencia a los antibióticos

Una de las medidas más efectivas para combatir el aumento de la resistencia a los antibióticos en *S. pneumoniae* fue la introducción de las vacunas conjugadas. La VCN7 se asoció con un significativo descenso en las tasas de resistencia antibiótica en *S. pneumoniae* en muchos países, incluida España (Liñares *et al.*, 2010). Como se explicaba en el párrafo anterior, el fenómeno de reemplazo de serotipos que producen ENI, sobre todo aquellos asociados a resistencia antibiótica, es preocupante.

Después de la introducción de la VCN7, empezaron a surgir aislados multirresistentes del serotipo 19A en todo el mundo (Fenoll *et al.*, 2015, Cassiolo *et al.*, 2018). Aunque la introducción de la VCN13 que cubría este serotipo redujo su tendencia ascendente, sigue siendo uno de los serotipos vacunales más frecuentes en ENI (Moore *et al.*, 2015, Glikman *et al.*, 2018, Ladhani *et al.*, 2018). Por otro lado, el uso de la VCN13 ha provocado el aumento de casos por serotipo 11A con alto nivel de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Aguinagalde *et al.*, 2015).

Para el tratamiento de las infecciones neumocócicas en las diferentes localizaciones se emplean como primera opción los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cuya diana son las proteínas de unión a penicilina (PBPs), inhibiendo la síntesis de la pared celular. Los primeros aislados clínicos con susceptibilidad reducida a penicilina (PEN) se describieron en los años sesenta del siglo pasado (Hansman y Bullen, 1967), expandiéndose a lo largo del mundo durante las décadas siguientes. Esta resistencia en neumococo se debe a una modificación de las proteínas de unión a penicilina (PBPs), por lo que resulta en una reducida afinidad tanto para las penicilinas como para otros  $\beta$ -lactámicos (Coffey *et al.*, 1995). Sin embargo, las cefalosporinas parenterales como la cefotaxima (CTX) o ceftriaxona (CRO), cefalosporina orales como cefditoren (CDN) y carbapenemes, son menos afectados y, por ello, son generalmente los compuestos más activos.

Del grupo de los macrólidos, la eritromicina (ERY) es el más utilizado para tratar infecciones producidas por *S. pneumoniae*. Los macrólidos inhiben la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S. Uno de los principales inconvenientes de este grupo es la pronta y elevada aparición de resistencias (Pérez-Trallero *et al.*, 2005, Liñares *et al.*, 2010). Esta resistencia está mediada por dos mecanismos: modificación de la diana, debido a una metilasa ribosómica codificada por el gen *ermC*; o por un sistema de bomba de flujo codificado por el gen *mef* que también confiere resistencia a numerosos miembros de la familia de los macrólidos (Leclercq y Courvalin, 2002).

## 1.4. Patogénesis de la enfermedad neumocócica

### 1.4.1. Adhesión y colonización

*S. pneumoniae* ha desarrollado la capacidad de colonizar las superficies mucosas del tracto respiratorio superior. Esta colonización es un requisito previo para la diseminación a zonas estériles causando la ENI, como ya se ha comentado. Para enfrentarse a las dos primeras barreras del hospedador, el moco y la lisozima, este patógeno ha desarrollado varias estrategias. Neumococo puede evadir el moco por tres vías diferentes: una gran parte de serotipos tienen un polisacárido con carga negativa que disminuye la probabilidad de ser atrapado por los residuos de ácido siálico presentes en la mucosa (Nelson *et al.*, 2007); neumococo tiene las exoglicosidasas NanA, NanB, BgaA y StrH que degradan los glicoconjugados del moco, disminuyendo la viscosidad y evitando el atrapamiento (Tong *et al.*, 2001, King *et al.*, 2006, Burnaugh *et al.*, 2008); por último, la neumolisina Ply, uno de los principales factores de virulencia, es una citolisina dependiente del colesterol que produce poros en las membranas celulares y disminuye los movimientos ciliares de las células epiteliales, permitiendo que neumococo se adhieran a las mismas con más facilidad sin ser eliminado por el moco (Feldman *et al.*, 1990, Feldman *et al.*, 2002). Además, para evitar la actividad de la lisozima, que es una muramidasa que rompe el peptidoglicano bacteriano al hidrolizar los enlaces que unen las moléculas acetiladas *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, neumococo posee las enzimas *N*-acetilglucosamina desacetilasa A (PdgA) y una *O*-acetiltransferasa (Adr) de los residuos de ácido *N*-acetilmurámico que le confieren resistencia a la actividad de la lisozima (Vollmer y Tomasz, 2000, Vollmer y Tomasz, 2002, Crisóstomo *et al.*, 2006, Davis *et al.*, 2008).

En el proceso de adhesión, neumococo utiliza sus diferentes proteínas de superficie que se unirán a los carbohidratos del hospedador, proteínas del plasma y proteínas de la matriz eucariótica. Hay diferentes familias de proteínas implicadas en la adhesión, entre las que se encuentran las previamente mencionadas CBPs, las proteínas de la familia LPXTG, lipoproteínas y otros tipos. En el apartado 1.2.2. ya se describieron diferentes ejemplos de CBPs implicadas en adhesión. Las proteínas LPXTG se unen covalentemente a la pared celular mediante una secuencia LPXTG; algunos ejemplos son la neuraminidasa NanA (Uchiyama *et al.*, 2009, Sharapova *et al.*, 2021) y las proteasas HtrA e Iga (Hendrickx *et al.*, 2011). Las lipoproteínas como PsaA

también tienen un papel importante en adhesión a las células del hospedador (Johnston *et al.*, 2004). También se demostró que una tercera parte de los neumococos sintetizan pili (Barocchi *et al.*, 2006, Aguiar *et al.*, 2008, Moschioni *et al.*, 2008), que confieren a las cepas que lo poseen una mejor adhesión (Löfling *et al.*, 2011).

Además del impedimento del moco y la lisozima, neumococo en la mucosa nasofaríngea es atacado por componentes del sistema inmune innato como la IgA secretora (sIgA) (Janoff *et al.*, 1999), la lactoferrina (Shaper *et al.*, 2004) y componentes del sistema del complemento (Picard *et al.*, 2003, Bogaert *et al.*, 2010). Para defenderse de los tres, neumococo utiliza varios mecanismos. Contra la sIgA, que al unirse al neumococo facilita la opsonización de la bacteria, utiliza la cápsula que impide su unión y la proteasa Iga que degrada IgA1 (Janoff *et al.*, 1999, Weiser *et al.*, 2003, Fasching *et al.*, 2007). Para contrarrestar la acción de la lactoferrina, que es un bacteriostático al secuestrar el hierro necesario para el metabolismo bacteriano e induce fagocitosis y muerte bacteriana, *S. pneumoniae* sintetiza la CBP PspA que se une al sitio activo de la apolactoferrina humana inhibiendo la actividad de la misma (Shaper *et al.*, 2004, Senkovich *et al.*, 2007). Los mecanismos de evasión del complemento por parte de neumococo se describirán más adelante.

Un aspecto importante destacable es que neumococo es capaz de cambiar su fenotipo y realizar variación de fase en la cual regulará la expresión de cápsula y otros factores de virulencia, para adaptarse al nicho en el que se encuentra. Esta variación de fase que alterna entre fase transparente y fase opaca se puede observar al microscopio (Weiser *et al.*, 1994, Loughran *et al.*, 2019). El fenotipo transparente en el que neumococo expresa mayores niveles de P-Cho y PspC en su superficie, facilitando la adhesión y colonización de la nasofaringe (Rosenow *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1999, Loughran *et al.*, 2019). En el fenotipo opaco por el contrario, neumococo expresa elevados niveles de capsula y proteína PspA, otorgando un fenotipo resistente a la fagocitosis y permitiéndole sobrevivir en la sangre (Kim y Weiser, 1998, Loughran *et al.*, 2019).

#### 1.4.2. Invasión, inflamación y shock

Para invadir el organismo neumococo utiliza la transcitosis que, adicionalmente, le permite formar reservorios bacterianos intraepiteliales y la recolonización posterior de la nasofaringe. Se han descrito dos mecanismos principales con los que neumococo es capaz de atravesar la barrera epitelial (Weiser *et al.*, 2018). El primero es la interacción de los dominios de P-Cho de los TAs y LTAs de neumococo con los receptores PAF que se encuentran en la superficie de células epiteliales respiratorias o células endoteliales vasculares activadas por citoquinas. Neumococo usa la ruta de reciclaje de los receptores PAF para entrar en la célula (Cundell *et al.*, 1996, Weiser *et al.*, 2018). El segundo mecanismo descrito es la interacción entre la CBP PspC y la porción extracelular del receptor de las inmunoglobulinas poliméricas (plgR) que se encuentra en las células epiteliales respiratorias (Brooks-Walter *et al.*, 1999, Hammerschmidt *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2000). Aquí también neumococo se aprovecha de una maquinaria de transcitosis de la célula para translocarse e invadir. A su vez, otra región de PspC puede unirse al receptor de laminina del endotelio microvascular del cerebro, facilitando la penetración de la barrera hematoencefálica que es importante para el desarrollo de meningitis neumocócica (Orihuela *et al.*, 2009). Finalmente, tanto el receptor PAF (PAFr) como el receptor de laminina son necesarios para la invasión de cardiomiocitos y la formación de microlesiones cardíacas, una de las complicaciones de la ENI (Brown *et al.*, 2014). Se ha descrito un mecanismo de macropinocitosis independiente de PAFr y que no requiere P-Cho, que se basa en interacciones con la actina (Loh *et al.*, 2017). La transcitosis no es la única vía de neumococo para invadir, la migración pericelular (o paracelular) que es otro mecanismo que utiliza para atravesar capas de células epiteliales y endoteliales (Pancholi *et al.*, 2003). Neumococo tiene la capacidad de adherirse y activar el plasminógeno mediante una serie de proteínas como la Eno, GapA y Pce, produciendo plasmina que es una serín proteasa que degrada las proteínas implicadas en uniones estrechas intercelulares afectando de este modo a la cadherina del endotelio vascular (Attali *et al.*, 2008, Dejana *et al.*, 2008). Además, se ha observado que Ply tiene la capacidad de abrir las uniones estrechas permitiendo el paso de neumococo (Rayner *et al.*, 1995).

Una vez llega a la membrana basal, compuesta principalmente de una red de colágeno tipo I, laminina y proteoglicanos, neumococo usa la hialuronato liasa para degradar los principales componentes de la matriz extracelular, facilitando así el desarrollo de la enfermedad invasiva (Jedrzejas, 2007, Maruyama *et al.*, 2009). Tras esta invasión se liberan una serie de productos bacterianos, muchos de ellos altamente proinflamatorios, que pueden conducir a una respuesta inflamatoria descontrolada en el hospedador produciendo la llamada tormenta de citoquinas. Esta hiperactivación del sistema inmune produce la mayor parte del daño tisular y orgánico tanto en neumonía y meningitis (Calbo y Garau, 2010, Gerber y Nau, 2010) como en el *shock* que tiene lugar en muchos casos tras la infección neumocócica (Calbo y Garau, 2011). Recientemente, se ha descrito que la desialización mediada por NanA altera la interacción Siglec-5-TLR-2 y reduce el reclutamiento de fosfatasa SHP-1 a Siglec-5. Este proceso activa vías de inflamación múltiples y muerte celular causando inflamación y citotoxicidad excesivas en el macrófago infectado (Tseng *et al.*, 2021).

### **1.5. Sistema inmune y *S. pneumoniae***

#### *1.5.1. El sistema del complemento*

Una de las primeras líneas de defensa del sistema inmune innato es el complemento, que está integrado por, aproximadamente, unas 30 proteínas plasmáticas y unidas a membrana celular, que al reconocer al microorganismo invasor inician una cascada regulada por diversas proteínas (Walport, 2001a, Walport, 2001b, Ballanti *et al.*, 2013, Syed *et al.*, 2020). Existen tres vías diferentes que desembocan en el componente clave C3b (**Figura 4.**).

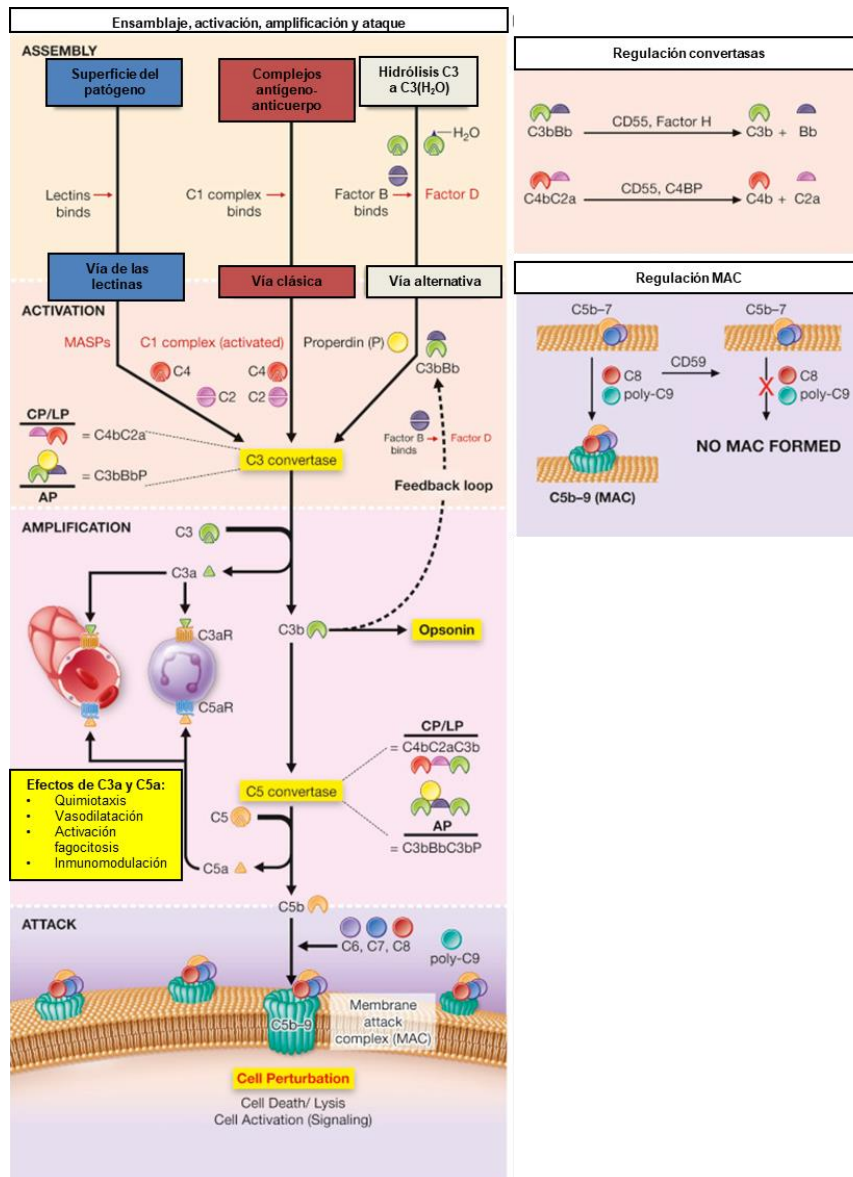


Figura 4. Activación de las tres vías del sistema del complemento. Reproducido y adaptado de Kulkarni *et al.*, 2018.

La vía clásica del complemento se inicia con el reconocimiento del patógeno por anticuerpos. Esta unión permite que el complejo C1 se una a la fracción constante (Fc) del anticuerpo, sobre todo a IgG e IgM (Schreiber y Frank, 1972, Syed *et al.*, 2020). El componente C1q de este complejo activa a las serín proteasas C1r y C1s. Esto lleva a la producción de C4 y C2 que genera C4b2a que es la convertasa del componente C3 de la vía clásica que genera C3b, capaz de unirse a la superficie bacteriana (Walport, 2001a, Heesterbeek *et al.*, 2018). Aun así, se ha demostrado la activación de la vía clásica en ausencia de anticuerpos específicos, ya que tanto C1q como IgM pueden reconocer directamente a determinados patógenos como neumococo (Brown *et al.*, 2002). También son capaces de unirse junto a CRP en un complejo reconociendo motivos P-Cho de la superficie bacteriana, o bien reconocer ligandos como pentraxina-3 y el componente P del suero amiloide (SAP) y unirse a marcadores de daño tisular como el ADN y membranas mitocondriales (Szalai *et al.*, 1999, Yuste *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2009, Terrasse *et al.*, 2012, Agarwal *et al.*, 2014, Syed *et al.*, 2020).

La vía de las lectinas se inicia cuando las lectinas de unión a manosa (MBL) o ficolinas se unen, de una forma dependiente de calcio, a carbohidratos que contienen residuos acetilados o manosa (Fujita *et al.*, 2004, Ip *et al.*, 2009, Endo *et al.*, 2011). Estas MBLs y ficolinas forman complejos con serín proteasas tipo 2 llamadas MASP (MBL-associated protease), estructuralmente homólogas a C1r y C1s, que permiten la formación de C4 y C2, originando la misma C3 convertasa que la producida por la vía clásica (Syed *et al.*, 2020). No se tiene muy claro la importancia de esta vía en neumococo, ya que no hay un vínculo claro en deficiencias de unión de MBL y susceptibilidad incrementada a las infecciones neumocócicas (Lundbo *et al.*, 2014).

La vía alternativa se basa en la hidrólisis espontánea de C3 y la deposición de C3b directamente a grupos hidroxilo de carbohidratos y proteínas de la superficie celular, de una manera no específica. Este C3b se podrá unir al factor B, exponiéndolo al factor D, formando un complejo que permite la amplificación de la activación del complemento degradando más C3 a C3a y C3b, uniéndose a la superficie (Walport, 2001a, Syed *et al.*, 2020). Esta vía alternativa es muy importante en la opsonización de *S. pneumoniae* ya que, ratones deficientes en factor D, presentan deficiencias en los niveles de opsonofagocitosis frente a neumococo (Xu *et al.*, 2001) y, además,

ratones deficientes en factor B son más susceptibles a la otitis media neumocócica (Tong *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2011).

Las tres vías de activación convergen en el componente C3b, que tiene un papel clave en la inmunidad innata. El propio C3b es capaz de actuar como una opsonina al reconocer los microorganismos e inducir la fagocitosis a través del receptor del complemento CR1 (Sahu y Lambris, 2001). También el componente generado de su hidrólisis, el iC3b es capaz de mediar la fagocitosis por los receptores del complemento CR3 y CR4 (Sahu y Lambris, 2001). Además, C3b es capaz de unirse a las convertasas de C5 (C4b2a3b y C4bBb3b) degradando el componente C5, que dará lugar a dos componentes: C5a (una anafilotoxina) y C5b, que iniciará la formación del complejo del ataque a la membrana (MAC) (Medicus *et al.*, 1976, Takata *et al.*, 1987, Bajic *et al.*, 2015). Cuando las convertasas rompen C5 en C5a y C5b, el fragmento grande C5b es estabilizado rápidamente con C6. Una vez se une C7 al complejo C5bC6, este complejo es lipofílico y se puede insertar en la membrana plasmática (Walport, 2001a, Kondos *et al.*, 2010, Syed *et al.*, 2020). Para la formación del MAC se unirán también C8 y entre seis y nueve moléculas C9. Es importante destacar que la formación del MAC hace que se lisen las bacterias Gram-negativas, pero en las Gram-positivas, como poseen una pared celular gruesa, se dificulta la penetración de este complejo hasta la membrana bacteriana (Joiner, 1985, Moffitt y Frank, 1994, Zipfel *et al.*, 2007). *S. pneumoniae* ha desarrollado varios mecanismos para evitar el depósito del complemento, siendo el principal el CPS que limita el complemento depositado en la superficie (Hyams *et al.*, 2010b). También dispone de una serie de proteínas de superficie como LytC, PspC, PspA, PsaA, PhpA y Ply que contribuyen a la reducción del complemento depositado (Zhang *et al.*, 2001, Jarva *et al.*, 2002, Ren *et al.*, 2004a, Quin *et al.*, 2005, Quin *et al.*, 2007, Ochs *et al.*, 2008, Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

La regulación del complemento es esencial para prevenir daño en las células del hospedador y limitar la inflamación local (Walport, 2001a). Esta regulación está mediada por componentes solubles del plasma y proteínas asociadas a membranas. Dependiendo de la vía hay unos reguladores negativos u otros. El C4BP es el principal regulador de la vía clásica, ya que se une a C4b y actúa como cofactor del factor I, hidrolizando C4b a C4d. También se puede disociar irreversiblemente la convertasa de C3 de la vía clásica (Gigli *et al.*, 1979, Blom *et al.*, 2003, Syed *et al.*, 2020). El fH

es el principal regulador negativo de la vía alternativa, ya que inhibe la actividad del complemento a nivel de C3b bloqueando la unión del factor B a este componente. Este factor también actúa de cofactor del factor I rompiendo C3b a iC3b y disociando la convertasa de C4 de la vía alternativa (Weiler *et al.*, 1976, Sahu y Lambris, 2001, Syed *et al.*, 2020). Otros ejemplos son la vitronectina y la clusterina, que impiden la inserción del complejo C5b-7 a la superficie celular y la polimerización de C9, inhibiendo la formación del MAC (Falgarone y Chiochia, 2009). Como se comentó previamente en el apartado de las CBPs, *S. pneumoniae* tiene proteínas como LytA y PspC que participan en la evasión de la inmunidad del complemento al reclutar reguladores negativos como fH y C4BP, impidiendo la activación de las vías clásicas y alternativa (Dave *et al.*, 2001, Jarva *et al.*, 2002, Janulczyk *et al.*, 2000, Hammerschmidt *et al.*, 2007, Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Además, PspC se puede unir a la vitronectina afectando a la inmunidad del complemento (Voss *et al.*, 2013, Kohler *et al.*, 2015).

### 1.5.2. Fagocitosis y receptores celulares

La fagocitosis es el proceso en el cual células del sistema inmune como los neutrófilos, macrófagos o células dendríticas, ingieren partículas sólidas, células muertas y agentes patógenos, introduciéndolas en el interior celular para proceder a su eliminación y coordinar su respuesta adaptativa (Botelho y Grinstein, 2011). En contraste a *Neisseria meningitidis*, la actividad bactericida del MAC no tiene importancia en *S. pneumoniae*, donde la fagocitosis es el principal mecanismo para combatir la infección neumocócica (Standish y Weiser, 2009). Previa a la fagocitosis microbiana, las diferentes opsoninas del suero se unen y reconocen a los patógenos para su eliminación (Marriott y Dockrell, 2007). Cuando el fagocito profesional contacta con el patógeno invasor, internaliza al microorganismo en vacuolas derivadas de su membrana plasmática llamadas fagosomas. Después se escinde la membrana y en el fagosoma madurará fusionándose con diferentes endosomas y lisosomas formando el fagolisosoma, con pH ácido y rico en hidrolasas que degradarán al patógeno internalizado (Botelho y Grinstein, 2011, Fairn y Grinstein, 2012). Esta degradación se da por una combinación de mecanismos oxidativos y no oxidativos (Dahlgren y Karlsson, 1999, Nauseef, 2007).

En el caso de neumococo y muchos otros microorganismos, la fagocitosis es el principal mecanismo de eliminación empleado por el sistema inmune del hospedador. Para esto es necesario que los fagocitos profesionales expresen receptores de alta afinidad para ciertas opsoninas destacando C3b e iC3b para ser reconocidos por los llamados receptores del complemento (Sahu y Lambris, 2001). Los principales receptores del complemento son CR1, CR2, CR3, CR4, CR5a y CR3a; la mayoría de ellos se unen a diferentes fragmentos y productos de C3 (Carroll, 1998, Holers, 2014). CR1 se encuentra ampliamente extendido en eritrocitos, leucocitos polimorfonucleares, fagocitos, linfocitos B y T, etc. Este receptor se une tanto a C3b como a C4b e, incluso, se puede unir a C1q (Holers, 2014). CR2 se une a productos de degradación de C3b como iC3b, C3dg y C3d y es importante para promover la activación de linfocitos B y la memoria inmunológica (Carroll, 2000, Holers, 2014). Tanto CR3 como CR4, que se pueden encontrar en los macrófagos situados en los tejidos y fagocitos mononucleares, se pueden unir al producto iC3b (Holers, 2014).

Otros de los receptores importantes que participan en la fagocitosis son los Fc $\gamma$ R (García-García y Rosales, 2002). Estos receptores se unen a la fracción Fc de los anticuerpos como IgG, desencadenando una cascada de señales que lleva a la reorganización de la actina y la membrana en los fagocitos, formando los pseudópodos que dan lugar al fagosoma (García-García y Rosales, 2002). Las isoformas Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA son las que contribuyen a la fagocitosis en humanos (Joshi *et al.*, 2006).

Por último, es interesante mencionar la importancia que está cobrando el ligando de la glicoproteína P-selectina-1 (PSGL1) en el reconocimiento directo de patógenos. Para que ocurra la extravasación leucocitaria, paso necesario para el encuentro del leucocito con el patógeno, es esencial la interacción entre las selectinas y los ligandos de selectina (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). Existen tres tipos de selectinas, en las cuales la P-selectina y la E-selectina son inducidas en respuesta a estímulos inflamatorios en células endoteliales activadas (Tedder *et al.*, 1995), una activación necesaria para protegerse de patógenos invasores como *S. pneumoniae* (Bullard *et al.*, 1996, Munoz *et al.*, 1997). Dentro de estos receptores que reconocen P- y E-selectinas se encuentra PSGL-1, con un papel esencial en los primeros pasos de la extravasación (Sako *et al.*, 1993, Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). Se ha observado que patógenos intracelulares obligados como *Anaplasma*

*phagocytophilum* y *Ehrlichia* sp. utilizan PSGL-1 para entrar en la célula y replicarse intracelularmente (Herron *et al.*, 2000, Cossart y Sansonetti, 2004, Troese y Carlyon, 2009). Pero lo más importante, se ha demostrado que PSGL-1, en neutrófilos, reconoce directamente el CPS y la LytA de *S. pneumoniae* fagocitándolo (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Además, la interacción con PSGL-1 es diferente según el CPS expresado y podría explicar la mayor prevalencia de algunos serotipos respecto a otros (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016).

## **2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS: CARACTERÍSTICAS Y PATOGÉNESIS**

### **2.1. Aspectos históricos**

En 1880, el cirujano escocés Alexander Ogston descubrió que una de las principales causas del pus tenía origen infeccioso (Ogston, 1984, Orenstein, 2011). El cirujano, cansado de la alta mortalidad asociada a las operaciones, decidió mirar al microscopio el pus que salía de uno de sus pacientes y descubrió micrococos (Ogston, 1882). A estos micrococos, por la disposición que formaban los clústeres, los denominó “staphylococci”, del griego staphyle, que significaba racimo de uvas (Orenstein, 2011). Posteriormente, en 1884, Rosenbach, un cirujano alemán, aisló dos cepas diferentes de “staphylococci”: a la cepa que formaba colonias pigmentadas la denominó *Staphylococcus aureus* y, a las que formaban colonias blancas, *Staphylococcus albus*, que posteriormente se denominaría *Staphylococcus epidermidis* (Rosenbach, 1884). En el momento del descubrimiento la mayoría de pacientes infectados con *S. aureus* morían, con una tasa de mortalidad cercana al 82% en los pacientes con septicemia (Skinner y Keefer, 1941, Oliveira *et al.*, 2018). Esta situación cambió y se redujo la mortalidad con la llegada de la penicilina a la práctica clínica (Ladhani y Garbash, 2005) pero, a principios de 1940, empezaron a surgir las primeras cepas resistentes a este antibiótico, llegando a representar un 25% de los aislados clínicos al final de la década (Rammelkamp y Maxon, 1942, Kirby, 1944, Chambers, 2001). La aparición de cepas resistentes a meticilina y la importancia de estas hace que se clasifique a este patógeno en dos categorías, *S. aureus* sensible a meticilina o SASM y *S. aureus* resistente a meticilina o SARM. La perspectiva histórica de la resistencia a antibióticos de *S. aureus* se comentará más adelante.

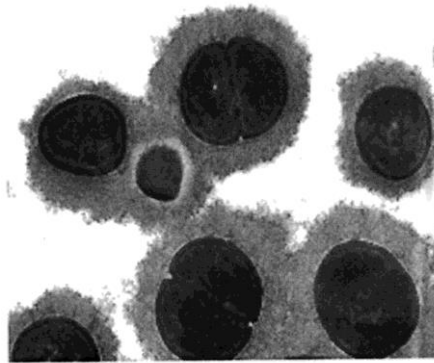
## 2.2. Características generales

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram-positivo de 0.5–2 µm de diámetro que se encuentran agrupados característicamente en racimos. Los estafilococos producen la enzima catalasa, diferenciándolos de los estreptococos y enterococos. Además, *S. aureus* se diferencia de otras especies de estafilococos de interés en medicina (como *S. epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*) por la producción de plasmacoagulasa (coagulasa), a los que denominaremos estafilococos coagulasa negativa (Harris *et al.*, 2002). Los estafilococos son inmóviles, no forman esporas y son anaerobios facultativos. Como requerimientos nutricionales necesitan una fuente orgánica de nitrógeno, suplementada con unos 5 a 12 aminoácidos entre ellos arginina y valina, también requieren vitaminas B como la tiamina y nicotinamida (Kloos, 1986, Wilkinson, 1997, Harris *et al.*, 2002). Además, son tolerantes a altas concentraciones de sal y muestran resistencia al calor (Kloos, 1986, Wilkinson, 1997). También los estafilococos se pueden diferenciar de los estreptococos por la composición de la pared celular (Wilkinson, 1997). En el caso de *S. aureus*, la pared en apariencia amorfa tiene un diámetro de 20–40 nm y el peptidoglicano es el componente básico representando un 50% de la masa de la pared celular. Los TAs y LTAs constituyen la otra parte importante con un 40% del total de la pared celular (Waldvogel, 1990), que además contribuyen a la carga negativa de la superficie celular y juegan un papel en la adquisición y localización de iones metálicos (Wilkinson, 1997), particularmente cationes bivalentes, y en la actividad de las enzimas autolíticas. El resto de la masa de la pared celular son proteínas de superficie, exoproteínas y las autolisinas (Harris *et al.*, 2002).

A diferencia de neumococo, *S. aureus* es muy versátil respecto a su hospedador, se puede encontrar, además de en humanos, en gatos y perros domésticos, caballos, cabras, ovejas, vacas, conejos, cerdos y pollos. Hay muchas enfermedades asociadas a estas especies, pero las que más impacto económico tienen son la mastitis en las vacas lecheras y otros rumiantes, enfermedades sistémicas letales en conejos y *bumblefoot* en aves (Peton y Le Loir, 2014, Peacock y Paterson, 2015).

### 2.2.1. Polisacárido capsular en *S. aureus*

Como en neumococo, el CPS es un factor de virulencia esencial debido a sus propiedades antifagocíticas que le permiten evadir el sistema inmune (Thakker *et al.*, 1998, Nanra *et al.*, 2013). Hasta un 90% de los aislados clínicos de *S. aureus* poseen CPS (Karakawa *et al.*, 1985, Thakker *et al.*, 1998, Harris *et al.*, 2002), existiendo hasta 11 serotipos distintos descritos hasta la fecha (Visansirikul *et al.*, 2020). Los dos más prevalentes son el serotipo 5 (CP5) y el 8 (CP8) (O'Riordan y Lee, 2004), cuya estructura química es muy similar ya que ambos consisten en unidades repetidas de ácido D-N-acetil manosaminurónico, L-N-acetil fucosamina y D-N-acetil fucosamina (Keinhörster *et al.*, 2019) (**Figura 5**). La diferencia entre ellos reside en los enlaces entre los azúcares y el sitio de O-acetilación del ácido manosaminurónico (Fournier *et al.*, 1984, Fournier *et al.*, 1987). El CPS está unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular (Chan *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Imagen al microscopio electrónico de transmisión de una cepa capsulada del serotipo 5 de *S. aureus*. Reproducido de O'Riordan y Lee, 2004.

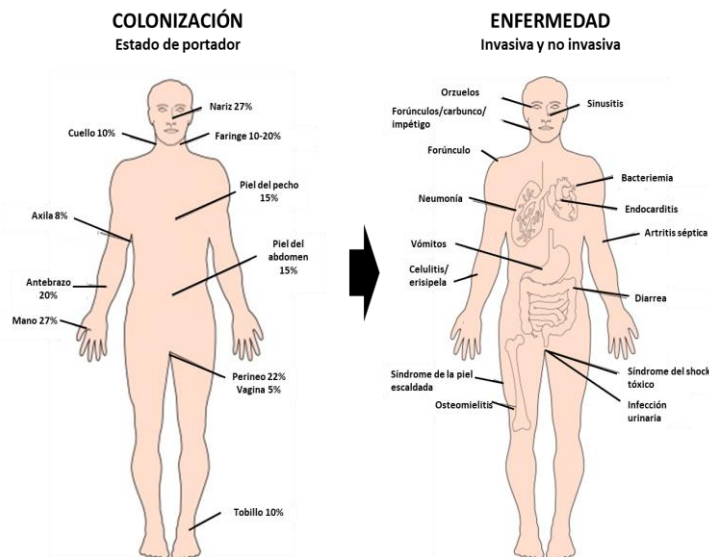
La presencia del CPS no siempre es una ventaja en la infección de *S. aureus* (O'Riordan y Lee, 2004, Tuchscherer *et al.*, 2010). Mientras que en modelos murinos de bacteriemia, en artritis séptica, abscesos e infecciones asociadas a heridas quirúrgicas sí que juega un papel esencial (Nilsson *et al.*, 1997, Thakker *et al.*, 1998,

Portolés *et al.*, 2001, Watts *et al.*, 2005, McLoughlin *et al.*, 2006, Keinhörster *et al.*, 2019), en infecciones de glándulas mamarias y endocarditis inducida por catéter los mutantes en el CPS son más virulentos (Baddour *et al.*, 1992, Nemeth y Lee, 1995, Tuchscher *et al.*, 2010). Esto podría deberse a que el CPS impide la unión de adhesinas a sus moléculas diana (Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000, Risley *et al.*, 2007). También la pérdida de expresión de CPS, que suele darse por mutaciones en genes esenciales para la síntesis del polisacárido o en regiones promotoras (Cocchiaro *et al.*, 2006, Tuchscher *et al.*, 2010), está asociada a infecciones crónicas por *S. aureus* como la osteomielitis, mastitis y fibrosis quística (Herbert *et al.*, 1997, Lattar *et al.*, 2009, Tuchscher *et al.*, 2010). Es importante destacar que la expresión de CP5 y CP8 es dependiente de las condiciones ambientales (Keinhörster *et al.*, 2019). En experimentos *in vitro* se observó que en condiciones de alta salinidad, limitación de hierro o medio sólido aumenta la expresión (Lee *et al.*, 1993, Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000, George *et al.*, 2015), mientras que el extracto de levadura, medios alcalinos, altos contenidos de glucosa y poca oxigenación disminuyen su expresión (Dassy *et al.*, 1991, Stringfellow *et al.*, 1991, Herbert *et al.*, 1997, George *et al.*, 2015). Además, durante las fases logarítmica y exponencial temprana apenas hay expresión de CPS, mientras que en la estacionaria y tardía estacionaria sí se expresa (George *et al.*, 2015).

### 2.3. Importancia clínica de *S. aureus*

A pesar de que el género *Staphylococcus* incluye 52 especies y 28 subespecies, *S. aureus* es la que tiene mayor relevancia clínica (Lee *et al.*, 2018). Además de ser uno de los principales patógenos causantes de infecciones intrahospitalarias. *S. aureus* se puede encontrar colonizando asintóticamente el tracto respiratorio superior humano en hasta el 80% de la población, variando según el estudio (Wertheim *et al.*, 2004, Wertheim *et al.*, 2005, Kuehnert *et al.*, 2006, van den Bergh *et al.*, 2012, Bosch *et al.*, 2013, Esposito *et al.*, 2014, Becker *et al.*, 2017). Aunque también se pueda encontrar en la microbiota comensal de la piel de más del 30% de individuos, la mucosa nasal es el principal nicho ecológico de esta bacteria (Wertheim *et al.*, 2005). Cuando la barrera mucosa o cutánea se rompen, *S. aureus* tiene acceso a zonas estériles y causa infección. En la mayoría de casos es necesaria la colonización de *S. aureus* para que se produzca la infección (Kluytmans *et al.*, 1997), aunque puede

darse minoritariamente por contaminación de catéteres o heridas. El rango de enfermedades que puede producir esta bacteria es amplio: desde más leves asociadas a manifestaciones en la piel y tejidos blandos como foliculitis, furúnculos, impétigo, mastitis, infecciones de heridas quirúrgicas y síndrome de la piel escaldada, a enfermedades más graves como bacteriemia, neumonía, endocarditis, infecciones en huesos y articulaciones y el síndrome del *shock* tóxico (**Figura 6**) (Peacock y Paterson, 2015). Una de las enfermedades mejor descritas que produce *S. aureus* y con más incidencia en la población es la bacteriemia (Tong *et al.*, 2015). La incidencia de esta patología infecciosa en países desarrollados es de 10 a 30 casos por 100 000 habitantes por año (Laupland *et al.*, 2013). Aunque los datos globales de estas tasas de incidencia se han mantenido durante los últimos 20 años, la contribución de SARM al desarrollo de episodios de bacteriemia muestra una tendencia ascendente (Wyllie *et al.*, 2005, Allard *et al.*, 2008, Laupland *et al.*, 2008, El Atrouni *et al.*, 2009). En el caso de la bacteriemia, la fuente primaria de infección predice la mortalidad, siendo la bacteriemia sin foco la que más mortalidad acumula (22–48%), seguida de la endocarditis (25–60%) y la neumonía (39–67%), mientras que tienen tasas menores la bacteriemia asociada a catéteres (7–21%), infecciones de piel o tejido blando (15–17%) y las infecciones del tracto urinario (10%) (van Hal *et al.*, 2012, Kaasch *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Esquema de las zonas que coloniza y las diversas afecciones producidas por *S. aureus*.

Las personas con dispositivos médicos invasivos (DMI) suelen ser más susceptibles a la infección por *S. aureus*, debido a que suelen ser infecciones relacionadas con el estado de biofilm, como se comentará más adelante. También los pacientes con el sistema inmune comprometido son un grupo de alto riesgo para estas infecciones (Lee *et al.*, 2018). Como se espera, la incidencia de bacteriemia y la mortalidad de estos episodios aumentan con la edad (van Hal *et al.*, 2012), también en pacientes con infección activa por VIH (Larsen *et al.*, 2012). Al igual que *S. pneumoniae*, *S. aureus* puede producir una neumonía secundaria a una primoinfección por el virus de la gripe (Murray *et al.*, 2010, Dawood *et al.*, 2010, van den Bergh *et al.*, 2012). Y la bacteriemia producida por *S. aureus* se ha asociado a ratios de mortalidad altos en pacientes hospitalizados con COVID-19 (Cusumano *et al.*, 2020).

### 2.3.1. *S. aureus* resistente a meticilina

Los primeros aislados resistentes a meticilina se describieron en 1961 en Inglaterra, al poco tiempo de introducir este antibiótico en la práctica clínica (Jevons, 1961). Aun así, mediante secuenciación del genoma completo, se han analizado cepas SARM previas a la introducción de la meticilina, que datan de los 40, con lo que hace pensar que su aparición fue debida al uso de la penicilina (Harkins *et al.*, 2017). La meticilina se usó ampliamente, pero debido a su toxicidad se dejó de utilizar en humanos y se reemplazó por otras penicilinas como oxacilina, flucloxacina y dicloxacilina (Lee *et al.*, 2018). En la primera década desde su descripción, los SARM fueron los culpables de diferentes brotes intrahospitalarios en diferentes partes del mundo (Chambers y Deleo, 2009), surgiendo el SARM asociado a hospitales (SARM-AH). Posteriormente, en los 80 y 90 se empezaron a ver aislados SARM en pacientes que no habían tenido ningún tipo de contacto hospitalario, surgiendo el SARM adquirido en la comunidad (SARM-AC) (Faoagali *et al.*, 1992, Fridkin *et al.*, 2005) y, por último, también se asocia a exposición a ganado (SARM asociado a ganado, SARM-AG) (Voss *et al.*, 2005). A pesar de que la meticilina no se usa ya en el entorno clínico, se ha mantenido el nombre SARM, y se denominan cepas resistentes a meticilina aquellas cepas que presentan una resistencia a casi todos los  $\beta$ -lactámicos, excepto a algunas cefalosporinas de última generación (Peacock y Paterson, 2015). Los aislados SARM también pueden adquirir resistencia a muchos otros antibióticos alternativos, complicando el tratamiento y la infección (Rodvold y McConeghy, 2014, Stryjewski y Corey,

2014), incluyendo antibióticos de último recurso como la vancomicina y agentes nuevos como linezolid y daptomicina (Gould *et al.*, 2012, Kos *et al.*, 2012, McGuinness *et al.*, 2017).

Al contrario que la resistencia de *S. aureus* a penicilina, la resistencia a meticilina no está mediada por una  $\beta$ -lactamasa codificada en un plásmido (Dyke *et al.*, 1966). El gen responsable de la resistencia a meticilina, llamado *mec<sup>c</sup>* en un principio, está localizado en el cromosoma (Sjöström *et al.*, 1975) y codifica una PBP con una afinidad reducida a los  $\beta$ -lactámicos que se denominó PBP2a (Hartman y Tomasz, 1984, Peacock y Paterson, 2015). Este gen se denominó *mecA* (Ubukata *et al.*, 1989). Posteriormente, al secuenciar la región alrededor de *mecA*, se descubrió un elemento genético móvil que se llamó *SSCmec* (por *Staphylococcal Chromosome Cassete*), presente en los aislados SARM y ausente en los aislados SASM (Katayama *et al.*, 2000). Los elementos *SSCmec* son variables, existiendo 11 tipos diferentes hasta la fecha (Ito *et al.*, 2012). Este elemento móvil contiene *mecA* y sus genes reguladores *mecI* y *mecR*, una recombinasa *ccr* que es la responsable del movimiento del *SSCmec* y tres regiones J (Peacock y Paterson, 2015). Este elemento *SSCmec* se usa para la vigilancia epidemiológica de los aislados SARM basado en su combinación de los genes *mec* y *ccr* y a veces la subtipificación basado en las regiones J (Ito, 2009). Todos los tipos de *SSCmec* contienen *mecA* excepto el tipo XI, que contiene su homólogo *mecC*, que dará lugar a la PBP2a<sub>LGA</sub>, nombrado así por la cepa SARM LGA251 de la cual se aisló por primera vez este *SSCmec* (García-Álvarez *et al.*, 2011). También se ha descrito resistencia a meticilina codificada en plásmidos, donde está implicado el gen *mecB* (Becker *et al.*, 2018).

## 2.4. Mecanismos de patogenicidad de *S. aureus*

### 2.4.1. Adhesión y colonización

Como ya se comentó previamente, la colonización de *S. aureus* precede la infección (Kluytmans *et al.*, 1997). Esta colonización no es estática, sino que la mayoría de estudios han encontrado tres patrones temporales (Höffler *et al.*, 1978, Eriksen *et al.*, 1995). En, aproximadamente, el 15% de los individuos, la colonización por *S. aureus* es continua; a estos se les denominará portadores persistentes. En torno al 70% de los individuos se puede encontrar una colonización intermitente, en la que podrán

adquirir cepas de *S. aureus* y librarse de él numerosas veces de manera espontánea. Por último, existe un porcentaje pequeño de la población que nunca serán portadores. El estado de portador estará determinado por factores del hospedador como polimorfismos en genes implicados en la respuesta inflamatoria (Emonts *et al.*, 2008). En los primeros pasos de adhesión a las células epiteliales del hospedador entran en juego los TAs de la pared celular, pudiéndose observar un incremento en la expresión de genes implicados en la síntesis de los TAs, mientras que otras adhesinas como CflB y IsdA se expresan en fases más tardías (Burian *et al.*, 2010). Los reguladores globales de virulencia también están implicados, ya que los genes *agr* y *sae* no están activos en las fases tempranas de la adhesión, pero el sistema de dos componentes WalkR sí que tiene un papel importante, existiendo una elevada expresión de los genes *sak* y *sceD* controlados por este sistema (Burian *et al.*, 2010).

En esta colonización inicial también importa la interacción con otras especies colonizadoras, compitiendo en las fosas nasales por ocupar este hábitat con especies como *Cutibacterium acnes*, *S. lugdunensis* o *S. epidermidis*. Estudios de colonización han mostrado que la existencia de ciertas especies se correlaciona con la presencia o ausencia de *S. aureus* (Liu *et al.*, 2015). Por ejemplo, la existencia de *S. epidermidis* se ha correlacionado positivamente con la presencia de *S. aureus* (Lemon *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2015). Al contrario, *S. lugdunensis* produce un compuesto antimicrobiano llamado lugdunina que inhibe y destruye a *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016). En la nasofaringe, otro nicho muy dinámico, compete con otras especies como *S. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*, cuya importancia clínica hace de especial interés esta interacción (Dunne *et al.*, 2013). Desde la era prevacuna neumocócica conjugada y hasta la introducción de la VCN-7, varios estudios han reportado una asociación negativa entre *S. pneumoniae* y *S. aureus*, describiendo que la portación de algún serotipo VCN-7 impedía la colonización por *S. aureus* (Regev-Yochay *et al.*, 2004, Spijkerman *et al.*, 2012, Chien *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2013). El mecanismo descrito que justificaba la asociación negativa implicaba la muerte de *S. aureus* por radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) producidos por neumococo, que inducían la degradación del ADN y la muerte del patógeno (Wu *et al.*, 2019). Sin embargo, otros estudios de colonización mostraban que hasta el 24% de los pacientes estaban colonizados por ambas especies (Melles *et al.*, 2007, Quintero *et al.*, 2011, Ebruke *et al.*, 2016) y que la vacunación con las vacunas conjugadas no había modificado la colonización de la nasofaringe por *S. aureus* (Cohen *et al.*, 2007, Lee

*et al.*, 2009). Además, la co-colonización entre ambas especies en modelos animales es posible (Park *et al.*, 2008, Margolis, 2009).

#### 2.4.2. Las toxinas de *S. aureus*

El hecho de que esta bacteria Gram-positiva sea un buen patógeno, puede atribuirse a su arsenal de factores de virulencia, donde las toxinas secretadas por *S. aureus* juegan un papel muy importante (Otto, 2010, Bartlett y Hulten, 2010, Oliveira *et al.*, 2018). Estas toxinas están relacionadas con diferentes enfermedades como el síndrome del *shock* tóxico, síndrome de la piel escaldada, neumonía necrotizante e infecciones de piel graves (Dinges *et al.*, 2000, Jarraud *et al.*, 2002, Ladhani y Garbash, 2005, Oliveira *et al.*, 2018). Las principales toxinas de estafilococo se pueden dividir en tres grupos: formadoras de poros, exfoliativas y súper antígenos (**Tabla 1**). Estas toxinas son capaces de dañar las membranas celulares del hospedador, degradar las conexiones intercelulares o modular la respuesta inmune (Grumann *et al.*, 2014).

En el grupo de las toxinas formadoras de poros se encuentran las dos principales hemolisinas. La  $\alpha$ -hemolisina la secretan el 95% de los aislados clínicos de *S. aureus* (Grumann *et al.*, 2014); se basa en monómeros proteicos que pueden oligomerizar, formando un barril  $\beta$  y alterando la membrana celular al formar poros (Seilie y Bubeck Wardenburg, 2017). *S. aureus* también tiene  $\beta$ -hemolisina, cuyo papel en la enfermedad no se entiende del todo pero que, en humanos, es citotóxica y parece importante en infecciones crónicas de piel y en mastitis bovina (Aarestrup *et al.*, 1999, Dinges *et al.*, 2000, Katayama *et al.*, 2013). También en este grupo se encuentran las leucotoxinas, que consisten en dos componentes proteicos diferentes que se ensamblan para formar barriles  $\beta$  que forman poros (Aman *et al.*, 2010, Yamashita *et al.*, 2011). Entre estas leucotoxinas la más conocida es la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), que tiene la subunidad proteica S que le confiere especificidad de tipo celular, con gran afinidad por leucocitos y neutrófilos (Aman *et al.*, 2010, Yoong y Torres, 2013), y la subunidad proteica F. Cuando se une la subunidad S a su receptor se produce un cambio conformacional permitiendo la dimerización con el componente F (Spaan *et al.*, 2015). La PVL se encuentra en el 5% de los aislados clínicos de *S. aureus* y se asocia con SARM-AC, particularmente aquellas que causan neumonía o infecciones de piel y tejidos blandos (Yoong y Torres, 2013). Las neumonías asocia-

das a la PVL son más letales, sobre todo porque la citotoxina provoca una hiperactivación de la inflamación (Gillet *et al.*, 2002). Las modulinas solubles en fenol (PSMs) son otro tipo de toxinas formadoras de poros, cuya unión no es específica, llevando a la desintegración de la membrana y su posterior oligomerización formando el poro (Otto, 2014). Estas modulinas están implicadas en la estructuración del biofilm y en la capacidad invasiva de *S. aureus* (Periasamy *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2007).

El segundo grupo de relevancia son las toxinas exfoliativas, que son serín proteasas que lisan la epidermis (Bukowski *et al.*, 2010). Estas toxinas reconocen e hidrolizan las uniones intercelulares, concretamente, las cadherinas desmosomales de las capas superficiales de la piel provocando descamación y formación de ampollas (Melish y Glasgow, 1971, Nishifuji *et al.*, 2008). Hay cuatro tipos de toxinas exfoliativas (ETs) denominadas A,B,C y D. La ETA y ETB son las implicadas en el daño de la piel en humanos (Lee *et al.*, 1987, Oliveira *et al.*, 2018). Estas ETs se encuentran en un 5% de los aislados clínicos de *S. aureus*, siendo ETA más prevalente en Europa, África y América y ETB en Japón (Ladhani, 2001). Estas cepas productoras de toxinas exfoliativas están asociadas al impétigo con ampollas localizado y al síndrome de la piel escaldada (Oliveira *et al.*, 2018). El gen *eta*, que codifica la ETA, tiene origen en un profago y está localizado en el cromosoma. Por el contrario, el gen *etb*, que codifica ETB, se encuentra localizado en un plásmido de 42 kb (Sakurai *et al.*, 1995, Mohseni *et al.*, 2018).

Por último, es importante destacar los superantígenos, que originalmente fueron denominados enterotoxinas, ya que estaban asociados a síntomas típicos de intoxicación alimentaria por *S. aureus*, como vómitos y diarreas (Grumann *et al.*, 2014). Este grupo se denominó finalmente de otra manera, ya que había toxinas que no tenían estas propiedades. Hay más de 23 superantígenos descritos en *S. aureus*, siendo los más destacables la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (como la SEA) y hasta 11 toxinas estafilocócicas tipo superantígeno (SSL) (Lina *et al.*, 2004, Holtfreter y Bröker, 2005, Grumann *et al.*, 2011, Grumann *et al.*, 2014, Oliveira *et al.*, 2018). Estas toxinas actúan uniendo directamente ciertos dominios V $\beta$  de receptores de los linfocitos T con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), activando de este modo, los linfocitos T (Fleischer y Schrezenmeier, 1988). Estos superantígenos actúan de manera sistémica, haciendo que un gran número de linfocitos T produzcan niveles elevados de

citoquinas proinflamatorias (IL-2, INF- $\gamma$  y TNF), causando una gran variedad de síntomas como fiebre, sarpullidos, descamación, vómitos, diarrea, hipotensión lo que puede resultar en fallo multiorgánico (McCormick *et al.*, 2001). Después de la tormenta de citoquinas, los linfocitos T no proliferan ni secretan IL-2 e incluso pueden sufrir apoptosis (Rellahan *et al.*, 1990, Alderson *et al.*, 1995).

**Tabla 1.** Las principales toxinas de *S. aureus*.

| <b>Las toxinas de <i>S. aureus</i></b> |  |   |
|--|--|---|
| <b>Grupo</b>                           | <b>Toxinas</b>   | <b>Acción</b>   |
| <b>Toxinas formadoras de poros</b>     | $\alpha$ -hemolisina   | Monómeros proteicos que oligomerizan formando barriles $\beta$ y alteran la membrana celular formando poros   |
|  | $\beta$ -hemolisina  | No se comprende su mecanismo pero es citotóxica   |
|  | Leucotoxinas   | Consisten en dos componentes proteicos diferentes que se ensamblan para formar barriles $\beta$ que forman poros. La PVL tiene especificidad por leucocitos y neutrófilos |
|  | Modulinas solubles en fenol  | Unión no específica; llevan a la desintegración de la membrana  |
| <b>Toxinas exfoliativas</b>            | Cuatro tipos: ETA, ETB, ETC y ETD. ETA y ETB son las implicadas en el daño de la piel en humanos | Reconocen e hidrolizan las uniones intercelulares, las cadenas desmosomales, de las capas superficiales de la piel  |

|                       |  |  |
|-----------------------|--|--|
| <b>Superantígenos</b> | Toxina del síndrome del <i>shock</i> tóxico (TSST-1) | Los superantígenos actúan uniendo directamente ciertos dominios V $\beta$ de receptores de los linfocitos T con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), activándolos. Estos linfocitos T activados producen una tormenta de citoquinas proinflamatorias causando gran variedad de síntomas. |
|                       | Enterotoxinas estafilocócicas (SEA)                  |  |
|                       | Toxinas tipo superantígeno (SSL)                     |  |

## 2.5. Sistema inmune y *S. aureus*

### 2.5.1. Sistema del complemento

Una explicación detallada del sistema de complemento se comentó en el apartado 1.5.1. de esta Memoria; en el caso de *S. aureus* se centrará en sus mecanismos de evasión. Al igual que en neumococo y otras bacterias Gram-positivas, el complemento es esencial para la opsonización de la bacteria por su depósito de C3b y otras opsoninas en la superficie (de Jong *et al.*, 2019). Uno de los principales mecanismos que tiene *S. aureus* para evadir la opsonofagocitosis es su CPS, que evitará su muerte (O'Riordan y Lee, 2004). Sin embargo, la cápsula no evita completamente la fijación del complemento o la unión de anticuerpos específicos (Cunnion *et al.*, 2001).

La metaloproteasa secretada por *S. aureus* (aureolisina), tiene la capacidad de hidrolizar el componente central de C3 en C3a' y C3b', mimetizando a las C3 convertasas, para luego degradar el C3b', el factor I y el factor H. Por tanto, su secreción crea un ambiente libre de C3 alrededor de la bacteria e impide el depósito del complemento (Laarman *et al.*, 2011). Otro ejemplo de proteínas que interfieren con el complemento es el inhibidor estafilocócico del complemento (SCIN), que es capaz de inhibir las tres vías del complemento estabilizando e inhibiendo las C3 convertasas, por lo que se

produce una disminución del depósito de C3b y liberación de C5a, cuya consecuencia es la inhibición de la fagocitosis (Rooijackers *et al.*, 2005a). También la proteína de unión a fibrinógeno extracelular de *S. aureus* (Efb), además de unirse a fibrinógeno, se puede unir a C3 y su producto C3d (Lee *et al.*, 2004, Hammel *et al.*, 2007b). Efb es capaz de bloquear la fagocitosis *in vitro*, ya que une la cascada de coagulación y el sistema del complemento, cubriendo la bacteria de fibrinógeno y evitando así el reconocimiento por C3b y anticuerpos funcionales (Ko *et al.*, 2013, Kuipers *et al.*, 2016). Homóloga a Efb es la proteína de unión al complemento extracelular de *S. aureus* (Ecb), que también puede unirse a C3d, bloqueando la C3 convertasa de la vía alternativa y también las C5 convertasas de las tres vías (Jongerijs *et al.*, 2007, Hammel *et al.*, 2007a, Jongerijs *et al.*, 2010).

*S. aureus* también tiene capacidad de reclutar el fH a su superficie con la proteína SdrE, que inhibe la vía alternativa del sistema del complemento (Sharp *et al.*, 2012). Otros ejemplos son: la proteína de adherencia extracelular Eap, que puede evitar la extravasación del neutrófilo e inhibir la unión de C2 al C4b, evitando la formación de las C3 convertasas de las vías clásica y de las lectinas del complemento (Chavakis *et al.*, 2002, Woehl *et al.*, 2014); la estafiloquinasa, que al degradar plasminógeno a plasmina en la superficie bacteriana hace que degrade IgG y C3bf, disminuyendo la fagocitosis (Rooijackers *et al.*, 2005b); la SSL7 que interacciona con IgA y el componente C5 (Langley *et al.*, 2005); y Cna que se une a C1q e inhibe la vía clásica del complemento (Kang *et al.*, 2013).

### 2.5.2. Fagocitosis y receptores celulares

Este patógeno también posee proteínas capaces de interferir con el reconocimiento de anticuerpos por parte de los fagocitos. Una de ellas es la proteína estafilocócica A (SpA), que es una proteína unida a la pared celular mediante un motivo LPXTG, pero puede ser liberada por hidrólisis durante el crecimiento de la bacteria (Schneewind *et al.*, 1992, Becker *et al.*, 2014). Esta proteína es capaz de unirse al Fc de las IgGs bloqueando la fagocitosis mediada por FcR (Forsgren y Sjöquist, 1966). También SpA puede interferir con la inmunidad adaptativa interfiriendo con los linfocitos B (Falugi *et al.*, 2013). Otro ejemplo, Sbi, es una proteína especial con doble función, ya que tiene cuatro dominios extracelulares globulares: los dominios I y II interaccionan con el Fc de IgG interfiriendo en su función (Atkins *et al.*, 2008). Además, es

capaz de unirse a la apolipoproteína H (Zhang *et al.*, 1999); los dominios III y IV se unirán al C3 y al fH, formando el complejo C3:Sbi:fH (Burman *et al.*, 2008, Haupt *et al.*, 2008). La proteína SSL10, también puede unirse a IgG1, impidiendo la activación del complemento por la vía clásica e impidiendo la fagocitosis mediada por el receptor Fc $\gamma$  (Itoh *et al.*, 2010, Patel *et al.*, 2010).

En el caso del reconocimiento por receptores celulares, además de los generales descritos en el apartado 1.5.2., no se ha descrito previamente en la literatura el reconocimiento directo por PSGL-1 de *S. aureus*.

### **3. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOFILMS BACTERIANOS**

#### **3.1. Características de los biofilms**

Tradicionalmente se han estudiado las bacterias como organismos individuales, en estado planctónico, hasta que se vio que realmente la mayoría se podían encontrar tanto en hábitats naturales como artificiales formando comunidades sésiles denominadas biofilms. Un biofilm es una comunidad microbiana sésil muy estructurada que se caracteriza por células unidas a una superficie o interfase y embebidas en una matriz extracelular de sustancias producidas por ellas (Costerton *et al.*, 1995). Las células en estos biofilms tienen un patrón de expresión completamente diferente y heterogéneo, formando micronichos en una comunidad microbiana compleja. Además, es importante resaltar la estructuración de estos biofilms, ya que hay una homeostasis dentro del mismo, teniendo incluso un sistema de canales de intercambio de nutrientes y fluidos, cooperación metabólica e intercambio de genes. Estos microambientes dentro del propio biofilm están diferenciados por pH, concentración de iones y tensión de oxígeno. El biofilm se caracteriza por ser genéticamente diverso, y el principal mecanismo para conseguirlo es una eficiente transferencia horizontal de genes dentro del mismo (Ehrlich *et al.*, 2010, Hiller *et al.*, 2010). Este proceso se dará más en regiones con mayor crecimiento que en las regiones más sésiles, con células persistentes, donde se acumulan productos metabólicos de desecho (Seoane *et al.*, 2011).

Los estudios basados en modelos de estado planctónico junto con el análisis de factores de virulencia pueden explicar la mayoría de enfermedades infecciosas agudas, pero son inadecuados para entender las enfermedades crónicas (Costerton *et al.*, 1999, Wolcott *et al.*, 2013). Sin embargo, el modelo de biofilm de Costerton y Stewart podía explicar varios aspectos como la infectividad de los anticuerpos y linfocitos en combatir ciertas infecciones asociadas a biofilm (Lam *et al.*, 1987, Leid *et al.*, 2005). También permite comprender la falta de capacidad de los antibióticos a la hora de combatir una infección asociada a biofilm (Stewart y Costerton, 2001). Y, por último, entender su capacidad para inducir una respuesta hiperinmune en el hospedador con un aumento de citoquinas proinflamatorias (Tregrove *et al.*, 1996), de metaloproteasas de la matriz (Tregrove *et al.*, 1999) y de proporción de neutrófilos (Diegelmann, 2003). Los biofilms están implicados en más del 80% de las enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas incluyendo la otitis media, la periodontitis, la endocarditis, úlceras gastrointestinales, infecciones del sistema urinario e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Costerton *et al.*, 1995, Costerton *et al.*, 1999, Wolcott y Ehrlich, 2008, Schaudinn *et al.*, 2009). Uno de los principales problemas en la práctica clínica con los biofilms es su menor susceptibilidad a los antibióticos, ya que hará falta hasta concentraciones 1000 veces superiores respecto a las que inhiben a la bacteria en forma planctónica (Stewart y Costerton, 2001, Mah y O'Toole, 2001, El-Azizi *et al.*, 2005). Aunque parece que algunos antimicrobianos tienen dificultad en penetrar la matriz del biofilm (Farber *et al.*, 1990, Jefferson *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2016), la alta tolerancia de los biofilms a agentes terapéuticos se debe principalmente al metabolismo alterado de las células embebidas en él (Stewart, 2002, Schilcher y Horswill, 2020). En general, las bacterias dentro de un biofilm muestran una actividad proliferativa y metabólica reducida, incrementando su tolerancia a los antibióticos dirigidos a la pared celular, y a la síntesis de ADN y proteínas (Hogan y Kolter, 2002, Waters *et al.*, 2016, Bui *et al.*, 2017). También, como se mencionó previamente, las poblaciones dentro del biofilm presentan una alta diversidad genética debido a la transferencia horizontal de genes (Ehrlich *et al.*, 2010, Hiller *et al.*, 2010). Esta resistencia puede deberse a la presencia de células bacterianas persistentes dentro del biofilm, que pueden sobrevivir al tratamiento antibiótico sin volverse resistentes (Balaban *et al.*, 2019).

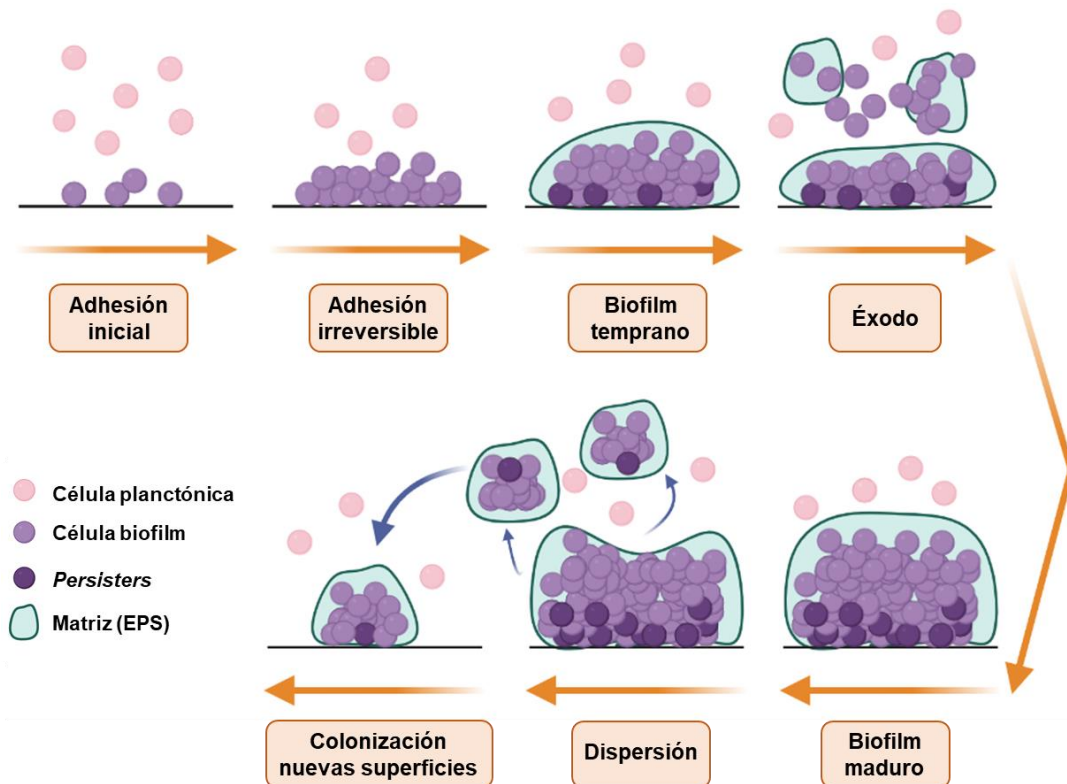
Otro de los problemas en clínica de estos biofilms bacterianos es que son capaces de evadir los sistemas de defensa inmune del hospedador (Domenech *et al.*, 2013b,

Scherr *et al.*, 2014). Una de las primeras evidencias se observó en *Mycoplasma pulmonis*, en el que la formación de biofilm protegía de los efectos líticos de la inmunidad del complemento (Simmons y Dybvig, 2007) y en *S. epidermidis*, que en estado de biofilm era capaz de evitar la muerte bacteriana mediada por neutrófilos evadiendo el depósito de C3b (Kristian *et al.*, 2008). En el caso de neumococo se observó que las células dentro del biofilm eran capaces de evadir el depósito de C3b en la superficie bacteriana (Domenech *et al.*, 2013b). Además, estas podían evitar la activación temprana de la vía clásica del complemento, evitando el reconocimiento por el C1q y por la proteína de fase aguda CRP. Se observó que no sólo afectaba a la vía clásica, sino que el biofilm neumocócico recluta el regulador negativo de la vía alternativa fH en mayor cantidad, debido a una mayor expresión de PspC en la superficie bacteriana del biofilm (Domenech *et al.*, 2013b). La consecuencia de todo esto es que la opsonofagocitosis del biofilm neumocócico es menor que en un cultivo planctónico. También se creyó que la resistencia al sistema inmune se debía al microambiente del biofilm actuando como una barrera física (Høiby *et al.*, 2001), pero se observó que, en el caso de *S. aureus*, las células del sistema inmune eran capaces de adherirse y penetrar en los biofilms (Leid *et al.*, 2002). *S. aureus* en forma de biofilm tiene diversos mecanismos para evadir el sistema inmune: los biofilms son capaces de evadir vías de reconocimiento como las mediadas por TLR 2 y 9 (Thurlow *et al.*, 2011); pueden secretar grandes concentraciones de leucocidinas como la PVL y la  $\gamma$ -hemolisina evitando su eliminación por neutrófilos (Bhattacharya *et al.*, 2018); y se ha atribuido al exopolisacárido de la matriz extracelular, que comparte con *S. epidermidis*, la capacidad de desacetilarse y evadir el sistema inmune (Vuong *et al.*, 2004).

### 3.1.1. Formación de un biofilm

La formación del biofilm es un proceso multifactorial y complejo, pero siempre empezará con una adhesión inicial reversible sobre una superficie abiótica, una superficie biótica o una interfase aire-líquido. Cuando la bacteria se adhiere a la superficie de forma irreversible, comienza a dividirse alrededor del sitio de unión formando una microcolonia. Estas bacterias empiezan a comunicarse por señales de *quorum sensing* (QS), ello regula la expresión de diferentes genes, y las bacterias adheridas secretan los componentes que formarán parte de la matriz extracelular del biofilm, como exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Posteriormente, el biofilm empieza a estructurarse, formando sistemas de canales que facilitan el transporte de nutrientes

y sustancias de desecho, y el biofilm continúa su crecimiento hasta alcanzar la maduración (**Figura 7**). Por último, existe una fase de dispersión, donde parte de las bacterias que integran esa comunidad microbiana, se liberan y colonizan una nueva superficie, cerrando así el proceso de desarrollo del biofilm (Bryers, 2008, Moormeier y Bayles, 2017, Schilcher y Horswill, 2020). En 2014, Moormeier y colaboradores observaron en un sistema de flujo continuo una fase previa al biofilm maduro de *S. aureus* a la que denominaron éxodo. Esta fase consiste en que el biofilm se reestructura y dispersa y utiliza mecanismos diferentes a los usados para la fase de dispersión final una vez el biofilm es maduro (Moormeier *et al.*, 2014, Moormeier y Bayles, 2017).



**Figura 7.** Fases en la formación de un biofilm. Imagen realizada con BioRender (<https://bio-render.com/>).

### 3.2. Biofilms de *S. pneumoniae*

En los últimos años se ha visto incrementado el número de trabajos sobre el biofilm neumocócico usando diferentes aproximaciones *in vitro* que cada vez se asemejan más a las condiciones *in vivo*. El primer sistema que se diseñó fue en 1997 y se basaba un crecimiento estacionario en filtros de celulosa (Budhani y Struthers, 1997), simulando la colonización de la nasofaringe (Waite *et al.*, 2001). Otra aproximación utilizó sistemas de flujo continuo, en el que se podía observar los diferentes fenotipos de *S. pneumoniae* durante el desarrollo del biofilm (Allegrucci *et al.*, 2006). Otra alternativa consistió en el desarrollo de un sistema estático con placas multipocillo de poliestireno y placas con fondo de vidrio para el estudio *in vitro* de los biofilms neumocócicos. Este sistema permite ver la influencia de diferentes factores como nutrientes, pH, osmolaridad y temperatura (Moscoso *et al.*, 2006, Domenech *et al.*, 2012), así como hacer una caracterización rápida de mutantes defectivos en la formación de biofilm (Muñoz-Elías *et al.*, 2008, Domenech *et al.*, 2009). El siguiente paso *in vitro* para aproximarse aún más a la formación de biofilms *in vivo* fue el desarrollo de un biofilm sobre cultivos celulares de células respiratorias por parte de Vidal y colaboradores (Vidal *et al.*, 2013). Estos biofilms neumocócicos se han detectado en la superficie de las glándulas adenoides y mucosas en niños con infecciones recurrentes del oído medio, otitis media con otorrea (Hall-Stoodley *et al.*, 2006, Coates *et al.*, 2008, Hoa *et al.*, 2009, Nistico *et al.*, 2011) y en las mucosas de pacientes con rinosinusitis crónica. También en modelos animales se han detectado estos biofilms, como en la mucosa del oído medio de chinchillas infectadas con *S. pneumoniae* (Weimer *et al.*, 2010, Perez *et al.*, 2014), como en el oído medio, nasofaringe, tráquea y pulmones de los ratones (Sanchez *et al.*, 2010, Perez *et al.*, 2014).

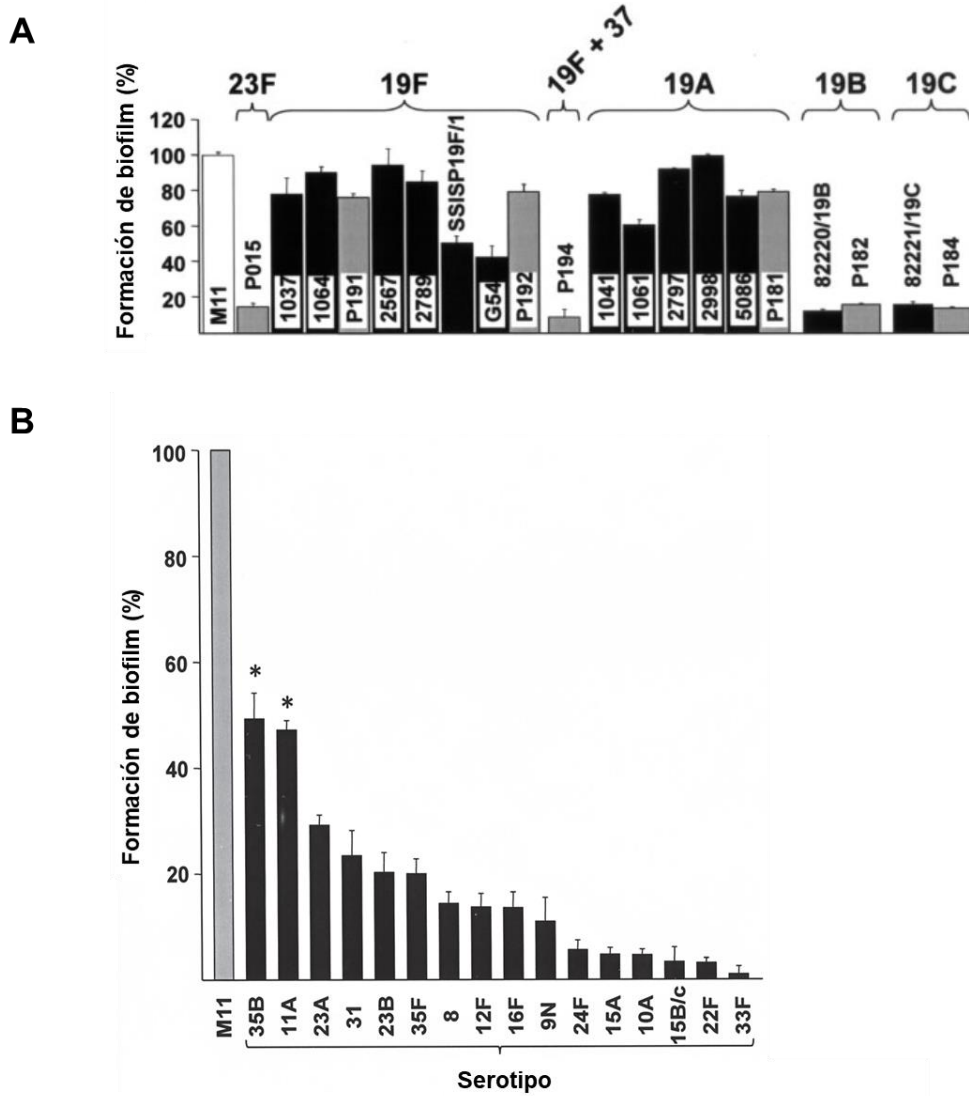
#### 3.2.1. Regulación del biofilm neumocócico

La regulación del biofilm neumocócico es compleja y multifactorial. Uno de los sistemas QS más estudiados en *S. pneumoniae* es el del péptido estimulador de la competencia (CSP) (Håvarstein *et al.*, 1995). Este sistema tiene el péptido precursor CSP codificado por el gen *comC* y el receptor ComD, que autofosforila al regulador ComE cuando el CSP alcanza un umbral de concentración (Pestova *et al.*, 1996). Además de inducir la competencia, este sistema de QS controla la virulencia y la formación de biofilm (Lau *et al.*, 2001, Vidal *et al.*, 2013). En concreto, se observó que al añadir

CSP se incrementaba el biofilm en superficies de plástico (Oggioni *et al.*, 2006), pero no en placas de poliestireno ni en los sistemas de flujo continuo (Trappetti *et al.*, 2011a), aunque posteriormente se apreció que sí que regulaba el biofilm en las estructuras producidas en biorreactores sobre células (Vidal *et al.*, 2013). Otro de los sistemas QS implicados en la formación de biofilm es el LuxS/AI-2 (Vidal *et al.*, 2011, Trappetti *et al.*, 2011c, Vidal *et al.*, 2013). En este sistema la enzima LuxS, codificada por el gen *luxS*, presente tanto en cepas invasivas como en cepas de portadores, sintetiza el AI-2 (autoinductor 2) que es necesario para regular la expresión génica (Reading y Sperandio, 2006). El sistema de QS Rgg/SHP también contribuye a la formación del biofilm al regular la expresión del CPS (Junges *et al.*, 2017). Además, se ha intentado estudiar la implicación de diferentes genes en la formación del biofilm neumocócico (Domenech *et al.*, 2009, Domenech *et al.*, 2012, Chan *et al.*, 2018, Hu *et al.*, 2019), entre ellos los genes capsulares, ya que una mayor capacidad de formar biofilms está directamente relacionada con una reducción tanto del tamaño de la colonia como de las cantidades relativas de CPS (Domenech *et al.*, 2009, Domenech *et al.*, 2012). Otros genes relacionados con la formación del biofilm son los que forman parte de sistemas toxina-antitoxina (Chan *et al.*, 2018), del sistema de dos componentes CiaRH (Trappetti *et al.*, 2011b), del metabolismo de carbohidratos (Domenech *et al.*, 2012) y otros muchos más. En cualquier caso, se ha puesto de manifiesto numerosas veces que el fondo genético de la cepa influye en la capacidad de formación de biofilm, encontrando fenotipos contradictorios en este proceso dependiendo de la cepa usada (Domenech *et al.*, 2012).

### 3.2.2. Importancia del CPS en el biofilm neumocócico

En el propio proceso de adhesión del neumococo la presencia y cantidad del CPS parece ser inversamente proporcional a la adhesión a células eucariotas (Selinger y Reed, 1979, Talbot *et al.*, 1996, Adamou *et al.*, 1998). Posteriormente se demostró que el CPS representa una barrera física en los primeros pasos de la formación de biofilm, ya que las cepas capsuladas usadas mostraban menor formación de biofilm *in vitro* que las no capsuladas (Moscoso *et al.*, 2006) y en biofilms del serotipo 3 los mutantes que tenían colonias y cápsulas más pequeñas presentaban mejor capacidad de formación de biofilm (Domenech *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Formación de biofilm por diferentes serotipos comparando con la cepa no capsulada M11 de fondo genético conocido. **(A)** Biofilm del serogrupo 19. **(B)** Biofilm por serotipos no VCN13. Imagen adaptada de (Domenech *et al.*, 2015, Domenech *et al.*, 2014).

Esto es compatible con la hipótesis de que neumococo regula la expresión de su CPS en su transición de colonizador en la nasofaringe, donde está asociada la formación de biofilm, al desarrollo de enfermedad invasiva (Hammerschmidt *et al.*, 2005). La falta de CPS hace que muchas proteínas de superficie asociadas a adhesión y virulencia queden expuestas y pueda facilitar la interacción del microorganismo con la superficie. Otro aspecto observado es que no todos los CPS impedían la formación de biofilm de la misma forma, mostrando que serotipos que eran buenos colonizadores y tenían una alta incidencia en colonización y ENI como son el 19F y el 19A, formaban un buen biofilm *in vitro* (Domenech *et al.*, 2014). Además, se observó que la formación de biofilm, podría considerarse como estrategia para predecir serotipos emergentes después de la introducción de las vacunas conjugadas neumocócicas (Domenech *et al.*, 2014, Domenech *et al.*, 2015) (**Figura 8**).

### 3.2.3. Matriz extracelular del biofilm neumocócico

Como se definió al principio, las bacterias en un biofilm están embebidas en una matriz extracelular compuesta por las llamadas sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Estas sustancias incluyen exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que, en su conjunto, determinarán la arquitectura del biofilm, dándole integridad estructural y cohesión.

Se demostró la presencia de al menos un exopolisacárido en la matriz del biofilm neumocócico usando una cepa no capsulada (Domenech *et al.*, 2013a). El análisis químico de este exopolisacárido junto con los resultados de la acción de diferentes enzimas indicó que el polisacárido de este biofilm tenía residuos de glucosa  $\beta(1\rightarrow4)$  y *N*-acetilglucosamina  $\beta(1\rightarrow4)$  con ramificaciones de Glucosa/Galactosa  $\alpha(1\rightarrow6)$  (Domenech *et al.*, 2013a). También se demostró la presencia de ADN extracelular (ADNe) y proteínas extracelulares ya que al añadir DNasa o proteasas antes o después de la formación del biofilm este se vio afectado, demostrando la importancia del ADNe como las proteínas extracelulares tanto para la formación como para el mantenimiento de la estructura del biofilm (Moscoso *et al.*, 2006). Este ADNe siempre se creyó que procedía de la autólisis bacteriana dentro del biofilm, pero se demostró que en biofilms *in vitro* había mecanismos independientes de autólisis implicados en la producción del ADNe (Domenech y García, 2018). Además, este ADNe junto con

proteínas extracelulares, específicamente las CBPs LytC, LytB y CbpD, pueden formar complejos intercelulares en la matriz, siendo un reconocimiento inespecífico del ADN por parte de las proteínas (Domenech *et al.*, 2013a). Una de las proteínas más esenciales para la formación de biofilm neumocócico es LytB (Domenech y García, 2020), que tiene una función activa y estructural clave en el biofilm.

### 3.3. Biofilms de *S. aureus*

*Staphylococcus aureus*, junto a *S. epidermidis*, es uno de los patógenos más notorios por su biofilm, siendo de especial importancia por causar infecciones crónicas sobre dispositivos médicos invasivos y adquirir resistencia a tratamientos terapéuticos en este estado. Algunos de estos dispositivos son catéteres, tubos endotraqueales, ventiladores mecánicos, prótesis y válvulas (Ribeiro *et al.*, 2012, Shoji y Chen, 2020). Estas infecciones relacionadas con el biofilm tienen una morbilidad y mortalidad incrementada, requiriendo la retirada del dispositivo y aumentando el tiempo de hospitalización. En España, un estudio sobre la prevalencia de las infecciones nosocomiales en los diferentes hospitales indicó un aumento de incidencia de infección asociada a catéteres, dispositivos implantables, prótesis articulares y un aumento elevado de la mortalidad en el caso de válvulas prostéticas (SEMPSPH y ECDC, 2017).

#### 3.3.1. Regulación del biofilm de *S. aureus*

La regulación del biofilm de *S. aureus* es una de los aspectos más estudiados hasta la fecha, siendo un proceso que está estrictamente regulado desde la adhesión inicial hasta la diseminación del biofilm maduro (Parsek y Greenberg, 2005, Schilcher y Horswill, 2020). Uno de los principales reguladores del desarrollo del biofilm en *S. aureus* son los sistemas QS, señales ambientales y otros reguladores como Sae, SarA y Rot (Thoendel *et al.*, 2011, Le y Otto, 2015, Wolska *et al.*, 2016, Kavanaugh *et al.*, 2019).

El principal sistema de QS en *S. aureus* es el sistema Agr, que se encuentra codificado en el cromosoma y está formado por dos unidades transcripcionales RNAII y RNAIII reguladas por dos promotores P2 y P3 (Novick *et al.*, 1993, Ji *et al.*, 1997). RNAII contiene los genes *agrBDCA* que sintetizan: el péptido autoinductor (AIP); la molécula a la que se unirá, AgrC, que se autofosforilará y empezará la cascada de

transducción; y el regulador AgrA, que inducirá la expresión de RNAlII mediante el promotor P3 (Novick *et al.*, 1995). RNAlII hace que se expresen proteínas secretadas como toxinas y exoenzimas y regula negativamente los genes que codifican adhesinas (Cheung *et al.*, 2011). Por lo tanto, para el inicio de la formación de biofilm el sistema Agr tiene que estar reprimido o con actividad baja y, posteriormente, activarse en ciertas zonas del biofilm produciéndose la disgregación del mismo, dando lugar a la fase final de dispersión después del biofilm maduro (Saravia-Otten *et al.*, 1997, Yarwood *et al.*, 2004, Schilcher y Horswill, 2020). Además, hay factores ambientales que afectan a la regulación del sistema de QS y de la formación del biofilm, por ejemplo, el pH y la disponibilidad de nutrientes. Una disminución de pH inhibe la transcripción de *agr* (Weinrick *et al.*, 2004). La disponibilidad de nutrientes también es importante ya que una disminución de glucosa en biofilms ya formados activará el sistema Agr produciendo la dispersión del biofilm (Boles y Horswill, 2008). Esta glucosa hace que se active la proteína de control del catabolismo A (CcpA), que regula positivamente *cidA* — liberándose ADN e *icaA*— un gen esencial para la producción del exopolisacárido (Seidl *et al.*, 2008).

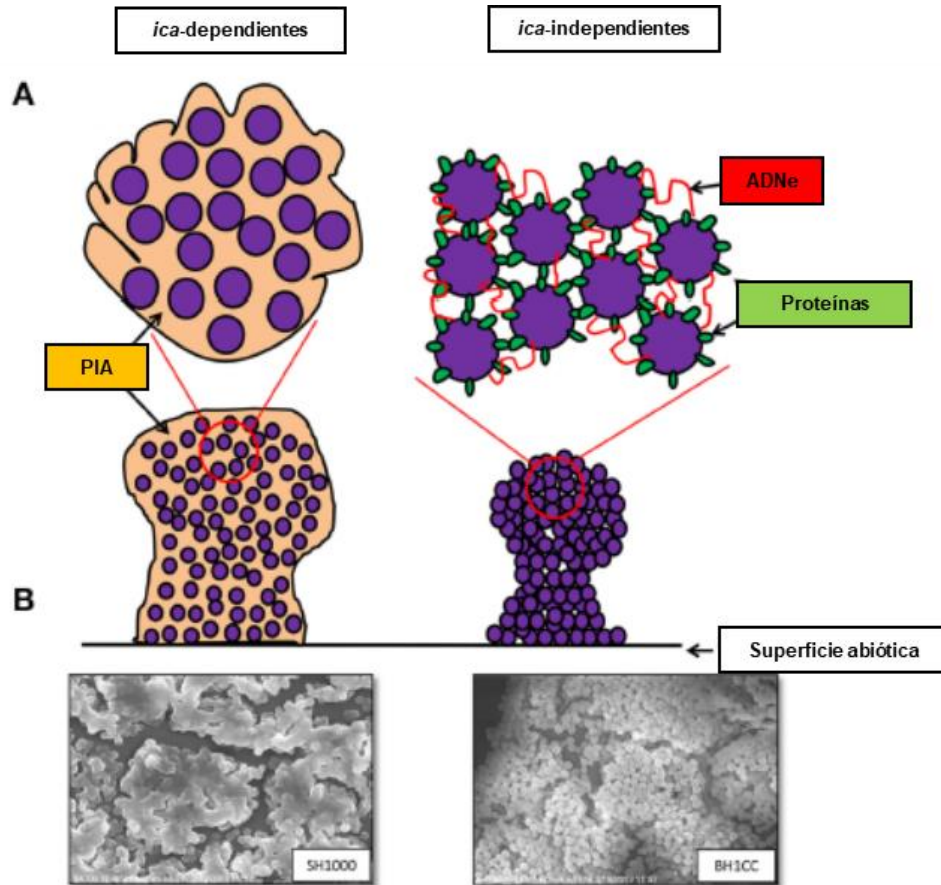
Hay numerosos reguladores, aparte de sistemas QS, implicados en la formación de biofilms. El sistema de dos componentes Sae basado en el sensor SaeS y en el regulador SaeR también controla la expresión del biofilm mediante la regulación de varias exoproteínas como la  $\alpha$ -hemolisina, las fibronectinas A y B y la termoneucleasa extracelular Nuc (Liang *et al.*, 2006, Rogasch *et al.*, 2006, Olson *et al.*, 2013, Flack *et al.*, 2014). El regulador accesorio de *S. aureus* llamado SarA es un factor de transcripción que induce también la expresión de la  $\alpha$ -hemolisina, las fibronectinas A y B y reprime la expresión de las proteasas extracelulares, por lo que es importante para la formación de biofilm (Chan y Foster, 1998, Xiong *et al.*, 2006, Mrak *et al.*, 2012, Zielinska *et al.*, 2012). También el factor sigma SigB de respuesta a estrés contribuye a la formación de biofilm mediante la regulación positiva de diferentes adhesinas como fibronectina A y el sistema SarA, y regulación negativa de nucleasas y proteasas, del sistema Agr (Ziebandt *et al.*, 2001, Horsburgh *et al.*, 2002, Atwood *et al.*, 2015). Existen otros ejemplos de reguladores de la formación de biofilm como el represor transcripcional CodY, el sistema de dos componentes LytSR, el sistema de QS LuxS/AI-2 y el AMP cíclico (Schilcher y Horswill, 2020).

### 3.3.2. Matriz extracelular del biofilm estafilocócico

Los biofilms estafilocócicos se pueden dividir en dos categorías según su matriz extracelular: biofilms que consisten en una matriz polisacáridica, denominados *ica*-dependientes, y los biofilms que poseen una matriz extracelular rica en proteínas y ADNe, llamados *ica*-independientes (**Figura 9**). En los biofilms que dependen de la síntesis del exopolisacárido, este representa el componente principal de la matriz. Este exopolisacárido en *S. aureus* se denomina poly- $\beta$ (1-6)-*N*-acetilglucosamina (PNAG), también llamado PIA (Mack *et al.*, 1996, Maira-Litrán *et al.*, 2002), y es sintetizado por las proteínas codificadas en el operón *icaADBC* que está estrictamente controlado por los reguladores IcaR y TcarR (Jefferson *et al.*, 2004). Además de estos biofilms dependiente de exopolisacárido, *S. aureus* puede formar biofilms basados principalmente en proteínas extracelulares, siendo la proteína asociada a biofilm (Bap), una de las más estudiadas (Cucarella *et al.*, 2001) y relevantes, ya que está implicada en la adhesión al sustrato y en la acumulación del biofilm. Se ha observado que Bap puede construir estructuras tipo amiloides que promueven la formación de biofilm (Taglialegna *et al.*, 2016, Ma *et al.*, 2021). Estos biofilms *ica*-independientes se han asociado principalmente a aislados SARM y aislados clínicos de *S. epidermidis*, mientras que los SASM suelen poseer matrices *ica*-dependientes (Fitzpatrick *et al.*, 2005, Rohde *et al.*, 2005, Kogan *et al.*, 2006, O'Neill *et al.*, 2007). En cualquier caso, este proceso es más complejo de lo que podría parecer, ya que aislados con el operón *icaADBC* pueden formar biofilms *ica*-independientes (Cucarella *et al.*, 2004).

También se puede considerar un tercer tipo de matriz en los biofilms de *S. aureus* cuyo componente principal es el ADNe. La importancia del ADNe se puso en evidencia con un mutante en AtIA, la principal autolisina, al mostrar una reducida formación de biofilm (Bose *et al.*, 2012), mientras que la mutación en la termonucleasa Nuc permitía una formación de biofilm incrementada (Kiedrowski *et al.*, 2011). Además, muchos biofilms maduros son susceptibles a la acción de la DNasa I, demostrando la importancia del ADNe en la estructura de la matriz extracelular del biofilm (Mann *et al.*, 2009). Asimismo, parece importante la interacción de proteínas con ADNe en esta matriz con, por ejemplo, lipoproteínas de la pared celular que contribuyen a la formación de biofilm (Kavanaugh *et al.*, 2019). Además, se demostró que factores de virulencia secretados así como proteínas ribosomales se encontraban atrapadas en

la matriz del biofilm, contribuyendo a su estabilidad, ya que mediaban las interacciones electrostáticas entre componentes de la superficie y ADNe (Graf *et al.*, 2019).



**Figura 9.** Biofilms de *S. aureus* ica-dependientes/independientes. (A) Representación gráfica de ambos fenotipos sobre una superficie abiótica. (B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de ambos fenotipos. Adaptado de McCarthy *et al.*, 2015.

### 3.4. Biofilms mixtos

La metagenómica ha demostrado que las bacterias que siguen la estrategia de formar un biofilm tienen muchos mecanismos para incluir diversidad microbiana (Wolcott *et al.*, 2013). La participación de diferentes especies bacterianas (o fúngicas) dentro del biofilm, hace que este adquiera numerosas ventajas, como resistencia pasiva a antibióticos, cooperación metabólica, activación de sistemas de QS y, como ventaja principal, una mayor capacidad de intercambio de genes de diferente procedencia microbiana. Se ha sugerido que, en biofilms polimicrobianos, la pluralidad genómica lleva a la producción de nuevas cepas, facilitando una infección persistente (Ehrlich *et al.*, 2005). Debido a la heterogeneidad microbiana en los diferentes nichos, se puede considerar que muchos de los biofilms que encontraremos son polimicrobianos, pudiendo tener desde diferentes cepas de la misma especie, diferentes especies del mismo género hasta incluso especies de diferentes reinos, como biofilms mixtos hongo-bacteria (Donlan y Costerton, 2002, Harriott y Noverr, 2011, Rodrigues *et al.*, 2019). Estos biofilms mixtos tendrán un tratamiento más complicado debido a la diversidad y complejidad de las relaciones interespecíficas, que afectarán tanto a la colonización, respuesta del hospedador, resistencia a antimicrobianos y progreso de la enfermedad (Ribeiro *et al.*, 2012, Mahajan *et al.*, 2013).

Los biofilms mixtos confirman la importancia de la interacción de diferentes patógenos con la microbiota normal de determinados lugares, como la nasofaringe, donde se encontrarán formando biofilm (Belkaid y Hand, 2014, Dunne *et al.*, 2018). En la enfermedad respiratoria es relevante considerar la interacción de virus respiratorios y cuatro patógenos bacterianos predominantes: *S. pneumoniae*, *H. influenzae* no tipificable, *S. aureus* y *M. catarrhalis*. En este sentido, se ha visto una microbiota más rica en diversidad bacteriana en niños que han sufrido ENI (Camelo-Castillo *et al.*, 2019). Se han realizado varias aproximaciones *in vitro* a estos biofilms mixtos, entre patógenos como *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (Domenech y García, 2017), *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* (Chew *et al.*, 2018), *S. pneumoniae* y *S. aureus* (Reddinger *et al.*, 2018), y el triple de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis* (Bair y Campagnari, 2019). Sin embargo, aún quedan muchos aspectos por conocer de la interacción entre los diferentes patógenos que viven en comunidad.

### 3.5. Terapias antibiofilms

Debido al difícil y prolongado tratamiento que requieren los biofilms, que entre otras cosas podría potenciar el desarrollo de resistencias antibióticas, se requieren nuevas terapias específicas antibiofilm. Debido a que es muy complicado tratar el biofilm una vez se ha establecido, otra estrategia que se ha desarrollado se basa en modificar las superficies de biomateriales, como catéteres e implantes, para evitar la adhesión y la formación del biofilm (Bridgett *et al.*, 1992, Peeters *et al.*, 2019). Varias estrategias antibiofilm se han puesto a punto, entre ellas: interferir con los sistemas QS (Quave y Horswill, 2014); degradar la matriz del biofilm o inhibir componentes de esta matriz (Dijlts *et al.*, 2020); administración de compuestos con efecto bactericida frente a las bacterias que componen el biofilm (Domenech y García, 2017). Una posibilidad para eliminar biofilms de *S. aureus* afectando a sistemas QS consiste en la administración del autoinductor AIP, que activará el sistema QS Agr produciendo la dispersión del biofilm y la vuelta a un fenotipo susceptible a antibióticos (Boles y Horswill, 2008). A nivel de degradación de la matriz del biofilm, existen varias moléculas que podrían hacerlo como es el caso de la dispersina B en *S. aureus* *ica*-dependiente o usando la DNasa I en biofilms de *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Moscoso *et al.*, 2006, Donelli *et al.*, 2007, Lauderdale *et al.*, 2010). El problema de esta dispersión del biofilm es que las bacterias liberadas del mismo, pueden infectar otras localizaciones al no tener efecto bactericida, por eso estos agentes deberían administrarse siempre con antibióticos para prevenir infecciones secundarias (Donelli *et al.*, 2007, Fleming y Rumbaugh, 2018). Entre los compuestos con efecto bactericida que más se han usado han sido agentes mucolíticos como la *N*-acetil-L-cisteína, que tiene un marcado efecto sobre biofilms monoespecie y biofilms mixtos y podría usarse en combinación con antibióticos (Blasi *et al.*, 2016, Domenech y García, 2017, Manoharan *et al.*, 2020). Por último, una estrategia alternativa a los antibióticos sería el uso de bacteriófagos y productos derivados de estos. Las enzimas líticas derivadas de fagos llamadas enzibióticos son lisinas codificadas por fagos que infectan a las bacterias o enzimas líticas bacterianas capaces de hidrolizar la pared celular de las bacterias y que en el caso de las de origen fágico, se expresarán al final del ciclo de replicación del mismo (Vázquez *et al.*, 2018). Un ejemplo es la LysCSA13 del bacteriófago CSA13 que se ha visto que afecta hasta el 90% del biofilm formado por *S. aureus* en diferentes superficies (Cha *et al.*, 2019). En el caso del neumococo, diferentes enzimas líticas como la Cpl-1 y Cpl-7 o la endolisina quimérica Cpl-711 son

capaces de destruir gran parte del biofilm (Domenech *et al.*, 2011, Vazquez y García, 2019).

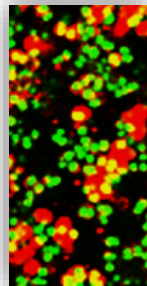
### **3.6. Los biofilms en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el humo de tabaco**

La EPOC es una alteración de la funcionalidad de las vías aéreas debido a un proceso inflamatorio sostenido. Esta se manifiesta como la coexistencia de dos enfermedades pulmonares: bronquitis, viendo las vías aéreas inflamadas; y enfisema, con exceso de esputo y la destrucción del parénquima pulmonar (Rom *et al.*, 2013). La EPOC se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad, siendo la cuarta causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2020). El principal factor de riesgo para el desarrollo de EPOC es el consumo de tabaco, tanto en los fumadores activos como en los pasivos (Nuorti *et al.*, 2000).

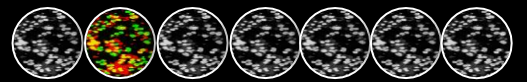
Una de las consecuencias de la EPOC es la infección crónica de las vías respiratorias bajas por diferentes patógenos. Estos pacientes sufren colonizaciones virales o bacterianas que dan lugar a agudizaciones de la enfermedad, y que reciben el nombre de exacerbaciones (EAPOC). Las bacterias más comúnmente asociadas a las EAPOC son *H. influenzae* (20–30%), seguida de *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* (10–15% ambas) (Sethi y Murphy, 2008). Seguramente, estas bacterias que colonizan las vías respiratorias inferiores de los pacientes EPOC se encuentran en estado de biofilm (Weeks *et al.*, 2021) y, al tratarse de ambientes polimicrobianos, estos biofilms no sean monoespecie, aunque se requieren más evidencias de este estado de biofilm en pacientes EPOC (Weeks *et al.*, 2021).

Por último, el humo de tabaco no sólo tiene un efecto en las vías respiratorias, sino que también afecta directamente a las bacterias que se encuentran en estas y, más específicamente, a su capacidad de formación de biofilm. En un reciente trabajo se ha observado que los niños expuestos a humo de tabaco de manera pasiva pueden desarrollar biofilms en la nariz, que podría llevar a infecciones persistentes como sinusitis y otras enfermedades respiratorias (Elwany *et al.*, 2021). La exposición de neumococo al extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la formación de biofilm por parte de la bacteria y afecta a la acción de la toxina Ply (Mutepe *et al.*, 2013, Hutcherson *et al.*, 2015). En *S. aureus*, este EHT también produce un aumento de la

formación de biofilm, debido a mecanismos de estrés oxidativo (Kulkarni *et al.*, 2012) y, además el EHT, dirige a *S. aureus* a un perfil de virulencia asociado a persistencia (Lacoma *et al.*, 2019).



## II. OBJETIVOS





Una de las maneras más eficientes de luchar contra la enfermedad neumocócica es el uso de medidas profilácticas como las vacunas. Desde la introducción de las diferentes vacunas conjugadas se ha producido un reemplazo por serotipos no incluidos en las vacunas, entre los que destacan los serotipos 22F y 33F como serotipos comunes incluidos en las dos nuevas vacunas conjugadas 15-valente y 20-valente. Varios de estos serotipos emergentes están asociados a resistencia a antibióticos, y es por ello, por lo que la vigilancia epidemiológica y el estudio de serotipos no vacunales emergentes en *S. pneumoniae* es de vital importancia.

*S. aureus* es un microorganismo patógeno con alto impacto en infecciones comunitarias e intrahospitalarias en España, sobre todo SARM. El estado de biofilm es vital para la patogénesis de este microorganismo, cuya composición de la matriz dependerá de factores genéticos y ambientales. Se han observado estadios de disgregación y formación de biofilm en sistemas de flujo continuo, pero los estudios son escasos y, en su mayoría, se han utilizado cepas de laboratorio con poca relevancia clínica.

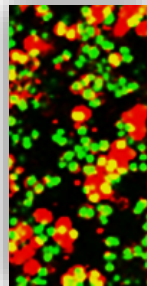
*S. aureus* y *S. pneumoniae* pueden encontrarse colonizando juntos la nasofaringe, y produciendo infecciones vinculadas a la formación de biofilm. Esto es preocupante a nivel clínico y debido a la mayor resistencia a antibióticos asociada al estado de biofilm, es necesaria la búsqueda de nuevas terapias antibiofilm. Los biofilms también suelen estar ligados a enfermedades infecciosas crónicas en pacientes EPOC, donde se ha observado que el tabaco no sólo afecta a la respuesta del epitelio pulmonar frente a la infección sino también frente al propio patógeno.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos que se plantean en esta tesis doctoral son los siguientes:

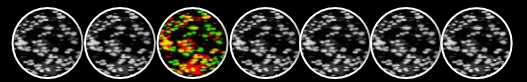
1. Caracterizar la epidemiología y patogénesis de los serotipos 22F y 33F en España y evaluar su capacidad de evasión del sistema inmune.
2. Estudiar la resistencia de aislados clínicos no susceptibles a penicilina frente a diferentes antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por *S. pneumoniae*.

## OBJETIVOS

3. Analizar el impacto de *S. aureus* en España y estudiar el estado de biofilm y evasión del sistema inmune en aislados clínicos.
4. Desarrollar sistemas de biofilm mixto *in vitro* de *S. aureus* y *S. pneumoniae* para el estudio de terapias antibiofilm.
5. Evaluar el impacto del humo de tabaco en biofilms de *S. aureus* y biofilms mixtos de *S. aureus* y *S. pneumoniae*.
6. Estudiar la capacidad de la vacuna VNC13 para inducir opsonofagocitosis frente a los biofilms de *S. aureus* y *S. pneumoniae* utilizando sueros de individuos vacunados.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. ESTIRPES BACTERIANAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las estirpes bacterianas y los oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral están detallados en las **Tablas 2, 3 y 4**. Los aislados clínicos de *S. pneumoniae* proceden del Laboratorio de Referencia de Neumococos en el Centro Nacional de Microbiología, donde se identifica la especie, se determina el serotipo y la concentración mínima inhibitoria a una serie de antibióticos. Los aislados clínicos de *S. aureus* proceden del Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias en el Centro Nacional de Microbiología, donde se identifica la especie, se estudian si son productores o no de toxinas, se analizan los genes *mecA* y *mecC* para confirmar la resistencia a meticilina y se estudian los mecanismos de resistencia a oxazolidinonas. En las **Tablas 2 y 3** no se reflejan los aislados clínicos empleados para los análisis epidemiológicos.

**Tabla 2.** Estirpes de *S. pneumoniae* utilizadas a lo largo de esta Memoria.

| Estirpe       | Descripción <sup>a</sup>                      | Referencia/Origen <sup>b</sup> |
|---------------|---|--------------------------------|
| <b>69</b>     | Serotipo 19F (Sangre)                         | (Soriano <i>et al.</i> , 2008) |
| <b>100/08</b> | Serotipo 22F (Ótico/Pediátrico) ST433/CC433   | LRN                            |
| <b>123/19</b> | Serotipo 14 (Sangre/Adulto)                   | LRN                            |
| <b>194/17</b> | Serotipo 22F (Sangre/Pediátrico) ST433/CC433  | LRN                            |
| <b>212/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Adulto) ST698/CC698      | LRN                            |
| <b>223/11</b> | Serotipo 22F (L-PL/Pediátrico) ST433/CC433    | LRN                            |
| <b>250/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Adulto) ST433/CC433      | LRN                            |
| <b>306/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Adulto) ST433/CC433      | LRN                            |
| <b>363/18</b> | Serotipo 33F (L-PL/Adulto) ST717/CC717        | LRN                            |
| <b>523/18</b> | Serotipo 22F (LCR/Adulto) ST13692/CC698       | LRN                            |
| <b>613/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Adulto) ST7314/CC433     | LRN                            |
| <b>627/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Adulto) ST717/CC717      | LRN                            |
| <b>644/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Pediátrico) ST717/CC717  | LRN                            |
| <b>782/15</b> | Serotipo 33F (Ótico/Pediátrico) ST1012/CC1012 | LRN                            |
| <b>800/18</b> | Serotipo 33F (L-PL/Pediátrico) ST717/CC717    | LRN                            |
| <b>840/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Adulto) ST717/CC717      | LRN                            |
| <b>854/12</b> | Serotipo 18C (Sangre/Adulto)                  | LRN                            |

|                |  |                                 |
|----------------|--|---------------------------------|
| <b>934/19</b>  | Serotipo 33F (LCR/Adulto) ST717/CC717  | LRN                             |
| <b>1000/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Adulto) ST13692/CC698   | LRN                             |
| <b>1018/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Pediátrico) ST717/CC717                                       | LRN                             |
| <b>1088/16</b> | Serotipo 33F (LCR/Pediátrico) ST717/CC717  | LRN                             |
| <b>1155/18</b> | Serotipo 22F (LCR/Pediátrico) ST433/CC433  | LRN                             |
| <b>1228/19</b> | Serotipo 19A (Sangre/Adulto)   | LRN                             |
| <b>1285/18</b> | Serotipo 22F (L-PL/Adulto) ST698/CC698   | LRN                             |
| <b>1407/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Pediátrico) ST3134/CC1439                                     | LRN                             |
| <b>1732/19</b> | Serotipo 11A (Sangre/Adulto)   | LRN                             |
| <b>1734/19</b> | Serotipo 8 (Sangre/Adulto)   | LRN                             |
| <b>1743/19</b> | Serotipo 3 (Sangre/Adulto)   | LRN                             |
| <b>1766/18</b> | Serotipo 22F (Sangre/Pediátrico) ST3134/CC1439                                     | LRN                             |
| <b>1833/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Pediátrico) ST717/CC717                                       | LRN                             |
| <b>1897/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Adulto) ST717/CC717   | LRN                             |
| <b>1945/15</b> | Serotipo 33F (Ótico/Pediátrico) ST717/CC717  | LRN                             |
| <b>1950/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Adulto) ST13320/CC717   | LRN                             |
| <b>1992/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Pediátrico) ST4668/CC717                                      | LRN                             |
| <b>2027/18</b> | Serotipo 33F (Sangre/Adulto) ST717/CC717   | LRN                             |
| <b>2153/17</b> | Serotipo 22F (Sangre/Pediátrico) ST433/CC433                                       | LRN                             |
| <b>2316/17</b> | Serotipo 33F (Sangre/Pediátrico) ST13320/CC717                                     | LRN                             |
| <b>2597/17</b> | Serotipo 22F (Sangre/Pediátrico) ST433/CC433                                       | LRN                             |
| <b>2780/17</b> | Serotipo 22F (Ótico/Adulto) ST13692/CC698  | LRN                             |
| <b>M11</b>     | Mutante no capsulado derivado de R6 (Hex <sup>-</sup> , <i>lytA</i> <sup>+</sup> ) | (Domenech <i>et al.</i> , 2014) |
| <b>P007</b>    | Transformante M11 con DNA de la cepa 406; serotipo 3                               | (Domenech <i>et al.</i> , 2009) |
| <b>P017</b>    | Transformante M11 con DNA de la cepa SSISP33F/1; serotipo 33F                      | (Domenech <i>et al.</i> , 2015) |
| <b>P224</b>    | Transformante M11 con DNA de la cepa 3017/13; serotipo 24F                         | (Domenech <i>et al.</i> , 2014) |
| <b>P244</b>    | Transformante M11 con DNA de la cepa 3014/13; serotipo 22F                         | (Domenech <i>et al.</i> , 2014) |
| <b>YNM1</b>    | Transformante M11 con DNA de la cepa 1743/19 ; serotipo 3                          | Esta tesis                      |
| <b>YNM2</b>    | Transformante M11 con DNA de la cepa 1734/19; serotipo 8                           | Esta tesis                      |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>YNM3</b> | Transformante M11 con DNA de la cepa 1732/19; serotipo 11A | Esta tesis |
| <b>YNM4</b> | Transformante M11 con DNA de la cepa 1228/19; serotipo 19A | Esta tesis |

a. ST, *secuencitipo*; CC, complejo clonal; L-PL, líquido pleural; LCR, líquido cefalorraquídeo.  
b. LRN, Laboratorio de Referencia de Neumococo del Instituto de Salud Carlos III.

**Tabla 3.** Estirpes de *S. aureus* utilizadas a lo largo de esta Memoria.

| <b>Estirpe</b>  | <b>Descripción<sup>a</sup></b>                                     | <b>Referencia/Origen<sup>b</sup></b> |
|-----------------|--|--------------------------------------|
| <b>60001/19</b> | MRSA(EH/Adulto) PVL <sup>+</sup> , serotipo 5                      | LIH                                  |
| <b>60020/17</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH                                  |
| <b>60021/17</b> | MSSA(EN/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                      | LIH                                  |
| <b>60025/18</b> | MSSA(EH/Pediátrico) PVL <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH                                  |
| <b>60031/19</b> | MSSA(Sangre/Adulto) serotipo 5                                     | LIH                                  |
| <b>60031/20</b> | MRSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH                                  |
| <b>60032/17</b> | MSSA(EH/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                      | LIH                                  |
| <b>60032/20</b> | MSSA(LB/Pediátrico) PVL <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH                                  |
| <b>60033/19</b> | MRSA(EH/Adulto) PVL <sup>+</sup> TSST <sup>+</sup> , serotipo 5    | LIH                                  |
| <b>60038/19</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                  | LIH                                  |
| <b>60039/20</b> | MRSA(Sangre/Adulto) PVL <sup>+</sup> , serotipo 5                  | LIH                                  |
| <b>60040/19</b> | MSSA(NP/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                  | LIH                                  |
| <b>60041/19</b> | MSSA(EN/Pediátrico) TSST <sup>+</sup> , serotipo 8                 | LIH                                  |
| <b>60061/19</b> | MRSA(EH/Adulto) serotipo 5   | LIH                                  |
| <b>60078/20</b> | MRSA(Sangre/Adulto) PVL <sup>+</sup> , serotipo 5                  | LIH                                  |
| <b>60085/19</b> | MSSA(L-PL/Pediátrico) PVL <sup>+</sup> , serotipo 8                | LIH                                  |
| <b>60093/20</b> | MRSA(EH/Pediátrico) PVL <sup>+</sup> , serotipo 5                  | LIH                                  |
| <b>60107/20</b> | MSSA(Sangre/Pediátrico) PVL <sup>+</sup> , serotipo 8              | LIH                                  |
| <b>60207/18</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH                                  |
| <b>60221/19</b> | MSSA(EC/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH                                  |
| <b>60223/19</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH                                  |
| <b>60225/19</b> | MSSA(EN/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                      | LIH                                  |
| <b>60228/19</b> | MSSA(EP/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH                                  |
| <b>60295/17</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH                                  |
| <b>60335/19</b> | MRSA(Sangre/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8              | LIH                                  |

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| <b>60389/17</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , <i>cap 8</i>                | LIH |
| <b>60404/18</b> | MSSA(EH/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH |
| <b>60412/19</b> | MRSA(EH/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                      | LIH |
| <b>60433/18</b> | MSSA(Sangre/Adulto) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH |
| <b>60443/19</b> | MRSA(EH/Adulto) PVL <sup>+</sup> ETA <sup>+</sup> , serotipo 8     | LIH |
| <b>60533/18</b> | MRSA(LCR/Pediátrico) TSST <sup>+</sup> , serotipo 5                | LIH |
| <b>60574/17</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH |
| <b>60574/19</b> | MRSA(EH/Adulto) ETB <sup>+</sup> , serotipo 5                      | LIH |
| <b>60598/17</b> | MSSA(GS/Pediátrico) ETB <sup>+</sup> , serotipo 5                  | LIH |
| <b>60601/17</b> | MSSA(L-PC/Pediátrico) ETB <sup>+</sup> , serotipo 5                | LIH |
| <b>60610/17</b> | MSSA(EN/Pediátrico) ETB <sup>+</sup> , serotipo 8                  | LIH |
| <b>60642/17</b> | MSSA(Absceso/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                 | LIH |
| <b>61615/14</b> | MRSA (EH/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                     | LIH |
| <b>61754/14</b> | MRSA (Sangre/Pediátrico) ETB <sup>+</sup> , serotipo 5             | LIH |
| <b>61949/15</b> | MSSA (EH/Adulto) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8    | LIH |
| <b>61950/15</b> | MSSA(EH/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> ETB <sup>+</sup> , serotipo 8 | LIH |
| <b>62600/15</b> | MSSA (EC/Pediátrico) ETA <sup>+</sup> , serotipo 5                 | LIH |
| <b>62822/15</b> | MRSA (Sangre/Adulto) ETA <sup>+</sup> , serotipo 8                 | LIH |

a. EC, exudado cutáneo; EH, exudado de herida; EN, exudado nasofaríngeo; EP, exudado perianal; GS, glándula suprarrenal; LB, lavado broncoalveolar; L-PC, líquido pericárdico; L-PL, líquido pleural; NP, necropsia pulmonar; ETA<sup>+</sup>, exfoliatina A<sup>+</sup>; ETB<sup>+</sup>, exfoliatina B<sup>+</sup>; LCR, líquido cefalorraquídeo; PVL<sup>+</sup>, leucocidina de Pantón-Valentine<sup>+</sup>; TSST<sup>+</sup>, toxina del síndrome de *shock* tóxico<sup>+</sup>.

b. LIH, Laboratorio de Referencia de Infecciones Intrahospitalarias del Instituto de Salud Carlos III.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados a lo largo de esta Memoria.

| <b>Nombre</b>  | <b>Secuencia (5'→3')</b>                 | <b>Utilización</b>             |
|----------------|--|--------------------------------|
| <b>aroE-F</b>  | GCCTTTGAGGCGACAGC                        | Para MLST <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>aroE-R</b>  | TGCAGTTCAGAAAACATATTTCTAA                | Para MLST <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>Cap5 K1</b> | GTCAAAGATT ATGTGATGCTACTGAG              | Serotipado <i>S. aureus</i>    |
| <b>Cap5 K2</b> | ACTTCGAATATAAACTTG AATCAATGTTA-<br>TACAG | Serotipado <i>S. aureus</i>    |
| <b>Cap8 K1</b> | GCCTTATGTTAGGTGATAAACC                   | Serotipado <i>S. aureus</i>    |
| <b>Cap8 K2</b> | GGAAAAACACTATCATAGCAGG                   | Serotipado <i>S. aureus</i>    |

|                     |  |                                 |
|---------------------|--|---------------------------------|
| <b>CST 01-M13-F</b> | TAAAACGACGGCCAGCATTTCGCATA-TCGTTTTG      | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>CST 01-M13-R</b> | CAGGAAACAGCTATGAC-CTGAGCTCTTTTTTCATGA    | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>CST 02-M13-F</b> | GTAAAACGACGGCCAGCATTCTCACAT-TATTTTTGATGT | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>CST 02-M13-R</b> | CAGGAAACAGCTA-TGACGTAACCTCGTTTCTTCATGA   | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>CST 03-M13-F</b> | GTAAAACGACGGCCAGCATTTCGCA-CATCGTCTTTG    | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>CST 03-M13-R</b> | CAGGAAACAGCTATGAC-CCGAGCTCTCTTTTTCATAA   | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>CST 04-M13-R</b> | CAGGAAACAGCTATGAC-CCTGAGCTCTCTTTTTTCATGA | Serotipado <i>S. pneumoniae</i> |
| <b>ddl-F</b>        | TGCC/TCAAGTTCCTTATGTGG                   | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>ddl-R</b>        | CACTGGGTGAAAACCATGGCAT                   | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>gdh-F</b>        | ATGGACAAACCACGATCAGCTTT                  | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>gdh-R</b>        | GCTTGAGGTCCCATGACTGATCCC                 | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>gki-F</b>        | GGCATTGGAATGGGATCACC                     | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>gki-R</b>        | TCTCCCGCAGCTGACAC                        | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>recP-F</b>       | GCCAACCTCAGGTCATCCAGG                    | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>recP-R</b>       | TGCAACCGTAGCATTGTAAC                     | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>spi-F</b>        | TTATTCCTCCTGATTCTGTG                     | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>spi-R</b>        | GTGATTGGCCAGAAGCGGAA                     | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>xpt-F</b>        | TTATTAGAAGAGCGCATCCT                     | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |
| <b>xpt-R</b>        | AGATCTGCCTCCTTAAATAC                     | Para MLST <i>S. pneumoniae</i>  |

## 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVOS

Las cepas se conservaron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en los diferentes medios de cultivo empleados a los que se añadió glicerol al 10-18% (v/v) (concentración final).

Para el cultivo de las cepas de *S. pneumoniae* se utilizó rutinariamente el medio C ajustado a pH 8.0 (CpH8) (Lacks y Hotchkiss, 1960) suplementado (C+Y) o no con extracto de levadura (Difco) (0,08%). Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas de agar de Mueller-Hinton suplementadas con 5% de sangre desfibrinada de oveja (Becton Dickinson). Para el aislamiento de *S. pneumoniae* en los sistemas de

biofilm mixto *in vitro* se utilizaron placas de agar de Mueller-Hinton (Thermo Scientific) suplementadas con 5% de sangre desfibrinada de oveja (Oxoid) y con una concentración de 2.5 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich).

Para el cultivo de las cepas de *S. aureus* se utilizó rutinariamente el medio TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco) suplementado con glucosa (0.4%) y extracto de levadura (0.3%)(TSBGY). Para el cultivo de *S. aureus* en los sistemas de biofilm mixto *in vitro* se utilizó el medio C+Y descrito previamente. Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con 5% de sangre desfibrinada de oveja (Becton Dickinson) y placas de TSA (Tryptic Soy Agar) (Difco). Para el aislamiento de *S. aureus* en los sistemas de biofilm mixto *in vitro* se utilizaron placas de agar manitol sal (Oxoid).

La multiplicación de los cultivos de *S. pneumoniae* y *S. aureus* se monitorizó por turbidimetría a 550 nm ( $A_{550}$ ) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20.

## **2.1. Estudios de susceptibilidad antibiótica**

En todos los aislados clínicos que reciben el Laboratorio de Referencia de Neumococo se realiza un antibiograma disco-placa con los antibióticos oxacilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina (ERY), clindamicina y levofloxacino (LVX) de la casa comercial BD (Becton Dickinson). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislados clínicos escogidos para el estudio del Capítulo 2 de esta Memoria se determinó por la técnica de dilución en agar (Fenoll *et al.*, 1991), de acuerdo con los criterios del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Se determinó la susceptibilidad antibiótica a la penicilina (PEN), amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), ERY, LVX y tres cefalosporinas orales incluyendo cefditoren (CDN), cefixima (CFX) y cefpodoxima (CFD). Para la interpretación de los resultados se siguió el criterio de EUCAST y, si para algún antibiótico no había ningún punto de corte definido por EUCAST o CLSI como la cefixima o cefditoren, se escogieron los mismos puntos de corte que para cefotaxima.

Para la determinación de la CMI a otros compuestos utilizados a lo largo de esta Memoria, se utilizó la técnica de microdilución, de acuerdo con los criterios del CLSI.

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana fueron repetidos un mínimo de tres veces para cada cepa.

### 3. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS

Los componentes de los medios de cultivo y reactivos de uso general fueron suministrados por las casas comerciales: Difco, Pronadisa, Oxoid, Sigma-Aldrich, Becton Dickinson y Merck. El péptido estimulador de la competencia, CSP1, de 17 aminoácidos (EMRLSKFFRDFILQRKK) fue sintetizado por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas Margaritas Salas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIBMS-CSIC). El azul tripán fue suministrado por Sigma-Aldrich. En la **Tabla 5** se describen los diferentes compuestos usados para la prevención y tratamiento de los biofilms de *S. pneumoniae* y *S. aureus*. Los fluorocromos, lectinas y anticuerpos usados se detallan en la **Tabla 6**.

**Tabla 5.** Compuestos usados para la prevención y tratamiento de los biofilms

| Compuesto                   | Descripción  | Procedencia                          |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|
| <b>CHAP<sub>k</sub></b>     | Mureín hidrolasa truncada que rompe la pared bacteriana de <i>S. aureus</i>                            | Dra. Auxiliadora Prieto (CIBMS-CSIC) |
| <b>Cisteamina</b>           | Aminotiol que se usa principalmente para el tratamiento de la cistinosis y cistinuria. Antioxidante    | Sigma-Aldrich                        |
| <b>Cpl-711</b>              | Mureín hidrolasa quimérica que rompe la pared bacteriana de <i>S. pneumoniae</i>                       | Dr. Pedro García (CIBMS-CSIC)        |
| <b>ChiDENPs-711</b>         | Nanopartículas de quitosano cargadas con el enzibiótico Cpl-711  | Dr. Pedro García (CIBMS-CSIC)        |
| <b>ChiDENPs</b>             | Nanopartículas de quitosano sin cargar   | Dr. Pedro García (CIBMS-CSIC)        |
| <b>DNAsa I</b>              | Desoxirribonucleasa I de páncreas bovino. Pureza de ≥85 %, ≥400 Kunitz units/mg                        | Sigma-Aldrich                        |
| <b>Metaperyodato sódico</b> | Compuesto oxidante que hidroliza enlaces C-C cuando ambos átomos de carbono poseen un átomo de oxígeno | Thermo Scientific                    |

|                            |   |                   |
|----------------------------|---|-------------------|
| <b>N-acetil-L-cisteína</b> | Antioxidante con propiedades mucolíticas con capacidad de romper enlaces disulfuro. | Sigma-Aldrich     |
| <b>Proteinasa K</b>        | Proteasa recombinante.<br>>600 U/mL (~20 mg/mL)                                     | Thermo Scientific |

**Tabla 6.** Fluorocromos, lectinas y anticuerpos utilizados.

| Compuesto                  | Descripción   | Excitación/<br>Emisión (nm)             | Fabricante                 |
|----------------------------|---|---|----------------------------|
| <b>BacLight</b>            | Kit para monitorizar la viabilidad de la población bacteriana en función de la integridad de la membrana celular (SYTO9/yoduro de propidio) | Viabiles 480/500<br>No viabiles 535/617 | Invitrogen                 |
| <b>BEAR1</b>               | anti-CD11b humano (conejo)  |   | Cedido por Dr. C. Bernabéu |
| <b>C3-FITC</b>             | anti-C3b humano conjugado con FITC (Cabra)  | 495/519                                 | Cappel (MP Biomedicals)    |
| <b>DDAO</b>                | 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-ona). No permeable  | 400/650                                 | Invitrogen                 |
| <b>Control Isotipo IgG</b> | Anti-IgG humano (ratón)   |   | Novus Biologicals          |
| <b>KPL-1</b>               | Anti-PSGL-1 humano (ratón)  |   | MBL                        |
| <b>SYTO9</b>               | Se une a ácidos nucleicos. Permeable  | 480/500                                 | Invitrogen                 |
| <b>SYTO59</b>              | Se une a ácidos nucleicos. Permeable  | 622/645                                 | Invitrogen                 |
| <b>WGA-Alexa flúor 488</b> | Aglutinina de germen de trigo ( <i>Triticum vulgare</i> ) conjugada al Alexa flúor 488. Se une a GINAc/ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)   | 495/519                                 | Invitrogen                 |

|                            |   |         |            |
|----------------------------|---|---------|------------|
| <b>WGA-Alexa flúor 594</b> | Aglutinina de germen de trigo ( <i>Triticum vulgare</i> ) conjugada al Alexa flúor 594. Se une a GINAc/ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (Neu5Ac) | 590/617 | Invitrogen |
|----------------------------|---|---------|------------|

### 3.1 Obtención de sueros humanos

Para la realización de algunos de los procedimientos descritos más adelante se requirió de muestras de suero procedentes de voluntarios sanos antes de la vacunación con la VCN-13 y un mes después de la misma. Se obtuvo consentimiento informado de todos los individuos que participaron en el estudio. El comité ético de investigación clínica del Hospital Universitario La Paz en Madrid, aprobó el estudio para la obtención de estos sueros (códigos de autorización HUIGRI-2014-01, HULP: PI-1832). Una vez obtenida la sangre se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min con el fin de separar el suero y guardar las alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Obtención del extracto de humo de tabaco

El extracto de humo de tabaco (EHT) se preparó a partir de cigarrillos de investigación producidos por la Universidad de Kentucky en EE.UU. Estos contienen 0.73 mg de nicotina, 9.4 mg de alquitrán y 12 mg de CO, siendo equivalente al contenido de cigarrillos comerciales como Marlboro®. La extracción se realizó usando un dispositivo descrito previamente (Martí-Lliteras *et al.*, 2009). La jeringa modificada dirige el humo del cigarrillo dentro de un frasco lavador de gases estéril que contiene C+Y o TSBGY (5 ml de medio de cultivo por cada cigarrillo). Cuando el humo llega al frasco lavador se agita vigorosamente de manera intermitente. El EHT obtenido, resultado de la combustión de 8 cigarrillos comerciales en 40 ml de medio de cultivo, fue designada como solución de EHT al 100% que se conservó en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA**

Para la transformación de neumococo se prepararon células competentes según el método descrito previamente con ligeras modificaciones (Tomasz, 1970): un cultivo exponencial en medio C+Y suplementado con 0.08% de seroalbúmina bovina (BSA) (C+Y+A) se diluyó 40 veces en un volumen final de 10 ml del mismo medio y se incubó hasta alcanzar una  $A_{550}$  de 0.18-0.2. Rápidamente se puso el cultivo en hielo, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y las células se concentraron 10 veces resuspendiéndolas en C+Y+A. Después, 0.1 ml de células competentes se incubaron con 0.9 ml de medio CpH8 suplementado con BSA al 0.08% (C+A) en presencia de 250 ng/ml de CSP1 durante 10 min a 37°C. A continuación, se añadió 1 µg del ADN donador de la cepa capsulada a un mínimo de 100 µl de células activadas y la mezcla se incubó durante 20 min a 30°C. Para la selección de mutantes se utilizó el suero anti-R que se une a las bacterias no capsuladas y estas aglutinan en el fondo del tubo (McCarty *et al.*, 1946, Ravin, 1959). En este proceso, se dejó que se realizara la expresión fenotípica durante 90 min a 37°C, pasando toda la mezcla a un nuevo tubo con 2 ml de C+Y conteniendo 50 µl de suero anti-R y se incubó a 37°C hasta observar la formación de un precipitado celular en el fondo del tubo. Se retiraron 100 µl de la parte superior del tubo que se añadieron a un nuevo tubo con C+Y y anti-R que se incubó de nuevo a 37°C. Tras sucesivos pases, los transformantes capsulados de neumococo se recuperaron de la parte superior del tubo. Posteriormente, se aislaron distintas colonias en placa y se comprobó la presencia de CPS y el serotipo correspondiente utilizando la PCR y secuenciación del gen capsular *wzh* y la inmunoreacción de *dot-blot*.

#### **5. TÉCNICAS DE ADN**

##### **5.1. Preparación de ADN cromosómico**

El ADN cromosómico de *S. pneumoniae* se preparó utilizando un procedimiento descrito previamente con pequeñas modificaciones (Fenoll *et al.*, 1994). Las células en un cultivo de C+Y con una  $A_{550}$  de 0.5-0.6 (10 ml) se sedimentaron por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 0.4 ml de de

tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6.9 (tampón SP) y 25 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se incubaron a 37°C hasta observar la lisis del cultivo. A los cultivos lisados se les añadió RNAsa (10 mg/ml) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Posteriormente se trataron con proteinasa K (100-200 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Las proteínas restantes se eliminaron mediante un tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (0.5 ml) realizando una agitación leve y, posteriormente, centrifugándolo durante 15 min a 12000 rpm, de esta manera se separa la fase acuosa de la orgánica e interfase (proteínas y contaminantes) con ayuda de los tubos *Phase Lock Gel light* (PRIME). Se volvió a realizar un lavado con cloroformo:isoamílico (24:1) y, posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm, la fase acuosa se separó en un tubo limpio. Para precipitar el ADN, se añadió etanol absoluto frío, manteniéndolo durante 30 min a -80°C. Para la eliminación de las sales contaminantes del ADN, se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 4°C, 10 min. El ADN sedimentado se dejó secar al aire para la eliminación completa del etanol de la muestra y se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA). Los ADN cromosómicos de *S. pneumoniae* para la caracterización de los aislados mediante MLST o secuenciación del gen capsular *wzh* se purificaron mediante el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega).

El ADN cromosómico de *S. aureus* se preparó mediante una extracción simple utilizando un tampón de lisis con lisostafina (Aguadero, V *et al.*, 2014). Brevemente, se resuspendieron colonias de un cultivo sólido en TSA en un tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 160 U/ml lisostafina) y se incubaron 30 min a 37°C. Posteriormente se incubó durante 10 min a 95°C. Se añadieron 900 µl de agua destilada y se centrifugó durante 10 min a 13200 rpm. Se retiró el sobrenadante y se lavó con isopropanol frío y, posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 13200 rpm. Se realizó un posterior lavado con etanol al 70%. El ADN sedimentado se dejó secar para la eliminación completa del etanol de la muestra y se resuspendió en tampón TE.

## 5.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 1.5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. A las muestras se les añadió 1/4 de su volumen de una solución de

azul de bromofenol al 0.2% (p/v) como tampón de carga. La electroforesis se realizó a 150 V durante 20 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con GelRed (Biotium) y los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron los marcadores de 100 pb de Invitrogen.

### 5.3. Reacción de la cadena polimerasa (PCR) y secuenciación

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN se empleó un equipo GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems y la enzima Taq polimerasa (EconoTaq Plus®, Lucigen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para la PCR del gen capsular *wzh* de *S. pneumoniae* se utilizó una PCR múltiple con los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 4**. La PCR del gen capsular *cap5k* o *cap8l* de *S. aureus* se realizó según la metodología previamente descrita (Verdier *et al.*, 2007). La secuenciación de los amplicones se realizó mediante secuenciación automática de Sanger (Elberse *et al.*, 2011).

Para realizar el MLST de las cepas de los serotipos 22F y 33F de *S. pneumoniae* se usaron los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 4**. Posteriormente se ensamblaron las secuencias utilizando el programa SeqMan del paquete Lasergene 7 y se utilizó la base de referencia de MLST de neumococo para asignar los diferentes alelos (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae>). Por último, para asignar los diferentes complejos clonales se utilizó eBURST (Feil *et al.*, 2004).

### 5.4. Secuenciación masiva: preparación de genotecas, secuenciación y ensamblaje

La extracción de ADN cromosómico de las cepas utilizadas para secuenciación masiva se realizó usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se construyeron las genotecas de ADN para la plataforma de secuenciación Illumina usando el kit de preparación *Nextera XT DNA sample preparation* (Illumina Inc), y a continuación, se secuenciaron usando un aparato de Illumina NextSeq 500 con lecturas de 2 × 150 pares de base apareadas (Illumina Inc).

El análisis de calidad y ensamblaje de las secuencias fue realizado por el Servicio de Bioinformática del Instituto de Salud Carlos III. Brevemente, la calidad de los datos de secuenciación masiva fue evaluada mediante FastQC, que proporciona información sobre la calidad de las lecturas. Se utilizó Trimmomatic para eliminar las lecturas que pertenecen a los adaptadores y recortar las regiones de baja calidad. El ensamblaje se realizó usando Unicycler y se evaluó la calidad del mismo mediante QUAST usando un genoma de referencia de *S. pneumoniae*. Para obtener los datos de *whole genome* MLST y *core genome* MLST se utilizó chewBBACA para ser posteriormente representados usando GrapeTree.

## 6. BIOFILMS

### 6.1 Biofilms de *S. pneumoniae*

Las condiciones óptimas para el crecimiento en biofilm de *S. pneumoniae* sobre superficies abióticas se han descrito previamente (Moscoso *et al.*, 2006; Domenech *et al* 2014). Para la formación del biofilm se usaron placas multipocillo de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Costar 3595; Corning Incorporated y Falcon 353072; Corning Incorporated). Brevemente, los cultivos de las diferentes cepas de *S. pneumoniae* se incubaron en medio C+Y a 37°C hasta una  $A_{550}$  de 0.5–0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio C+Y. A continuación, las placas se inocularon con 200  $\mu$ l por pocillo ( $4.5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC)/pocillo) y por triplicado y se incubaron durante 5 h a 34°C. En el caso de los estudios de evolución de biofilms de *S. pneumoniae* la incubación fue desde 2 h hasta 6 h. El crecimiento total bacteriano (bacterias adheridas y no adheridas) se determinó midiendo la  $A_{595}$  utilizando un lector de placas (Tecan Infinite F200; Tecan Group Ltd. y Epoch 2; BioTek). Posteriormente, se cuantificó el biofilm tiñendo cada pocillo con 50  $\mu$ l de una solución de cristal violeta al 1% (CV) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados con 200  $\mu$ l de agua destilada y se dejó secar al aire. La formación de biofilm teñido con CV se cuantificó solubilizando éste con 200  $\mu$ l de etanol al 96% por pocillo y midiendo la  $A_{595}$ .

En el caso del análisis del biofilm formado mediante recuento de viables, después de la incubación del biofilm, se retiró el cultivo planctónico, se realizó un lavado con agua

destilada estéril y se resuspendió el biofilm en 100 µl de tampón SP (pH 6.9) estéril por pocillo. Posteriormente, se realizó un banco de diluciones y se sembraron en placas de agar sangre Mueller-Hinton que se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 h. Al día siguiente se realizó el recuento de bacterias viables.

#### 6.1.1. Inhibición y disgregación del biofilm de *S. pneumoniae*

Los ensayos de inhibición del biofilm consisten en añadir desde el principio el compuesto a ensayar junto con el inóculo bacteriano. Una vez finalizado el tiempo de incubación a 34°C se procesó el biofilm como se describe en el apartado 6.1.

Los ensayos de disgregación del biofilm se realizaron una vez formado dicho biofilm, como se describe en el apartado 6.1 (se estandarizó en casi todos los casos 4 h de formación de biofilm), se realizó una medida de control de crecimiento total transcurrido el tiempo de formación del biofilm. Posteriormente se retiró el cultivo planctónico, se lavó el biofilm con agua destilada estéril y se añadieron 200 µl por pocillo del tampón SP o el tampón óptimo para el compuesto a probar y se añadió el compuesto a analizar. Se realizó una nueva medida de  $A_{595}$  y se incubó a 37°C durante el tiempo adecuado dependiendo del compuesto o enzima a probar, generalmente durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó el análisis del biofilm por CV y/o el recuento de viables como se describe en el apartado previo.

#### 6.2 Biofilms de *S. aureus*

Las condiciones óptimas para el crecimiento en biofilm de *S. aureus* sobre superficies abióticas se realizaron siguiendo un protocolo modificado (Domenech *et al.*, 2012). Para la formación del biofilm se usaron placas multipocillo de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Costar 3595; Corning Incorporated y Falcon 353072; Corning Incorporated). Brevemente, los cultivos de las diferentes cepas de *S. aureus* se incubaron en medio TSBGY a 37°C hasta una  $A_{550}$  de 0.5-0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio TSBGY obteniendo una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  UFC/mL. A continuación, se inocularon con 200 µl por pocillo y por triplicado y se incubaron durante 24 h a 37°C. En el caso de los estudios de evolución de cepas de *S. aureus* la incubación fue desde 5 h hasta 28 h. El crecimiento total bacteriano se determinó midiendo la  $A_{595}$  utilizando

un lector de placas (Tecan Infinite F200; Tecan Group Ltd. y Epoch 2; BioTek). Posteriormente, se retiró el cultivo planctónico y se añadieron 200 µl de agua destilada más 50 µl de CV por pocillo y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con 200 µl de agua destilada por pocillo y se dejó secar al aire. La formación de biofilm teñido con CV se cuantificó solubilizando este con 200 µl de etanol al 96% y midiendo la  $A_{595}$ .

Para el recuento de viables del biofilm, después de la incubación, se retiró el cultivo planctónico, se lavó con agua destilada estéril y se resuspendió el biofilm en 100 µl de tampón SP estéril. Finalmente, se realizó un banco de diluciones y se sembraron en placas de TSA que se incubaron a 37°C durante 20 h. Al día siguiente se realizó el recuento de bacterias viables.

Para los experimentos de los biofilms mixtos *S. aureus*–*S. pneumoniae*, se puso a punto el protocolo de biofilm de *S. aureus* en C+Y (Sempere *et al.*, 2021), descrito en el apartado 6.3.

#### 6.2.1. Inhibición y disgregación del biofilm de *S. aureus*

Los ensayos de inhibición consisten en añadir desde el principio el compuesto a ensayar junto con el inóculo bacteriano, tal y como se describe en el apartado 6.1.1.

Los ensayos de disgregación se realizaron después de 23 h de formación del biofilm de *S. aureus*, y posterior medida de control de crecimiento del biofilm. Después de retirar el cultivo planctónico, se lavó el biofilm con agua destilada y se añadieron 200 µl por pocillo del tampón SP o el tampón óptimo para el compuesto a probar y el compuesto a analizar. Se realizó una nueva medida de  $A_{595}$  y se incubó a 37°C durante el tiempo adecuado dependiendo del compuesto o enzima a probar, generalmente durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó el análisis del biofilm por CV y/o el recuento de viables.

### 6.3 Biofilms mixtos de *S. aureus*–*S. pneumoniae*.

Para la formación del biofilm mixto se realizaron modificaciones del protocolo descrito en el apartado 6.1. Para ello, se usaron placas multipocillo de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Costar 3595; Corning Incorporated). Brevemente, los cultivos de las diferentes cepas de *S. pneumoniae* y *S. aureus* se incubaron en medio C+Y a 37°C hasta una  $A_{550}$  de 0.5-0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio C+Y. A continuación, las placas se inocularon con 200  $\mu$ l por pocillo con una mezcla de diferentes proporciones de *S. aureus* y *S. pneumoniae* conteniendo desde  $8 \times 10^5$  hasta  $8 \times 10^6$  UFC/mL y se incubaron de 2 a 6 h a 34°C. El resto del procedimiento se realizó como está descrito en el apartado 6.1. Las inhibiciones y disgregaciones se realizaron como están descritas en el apartado 6.1.1.

### 6.4. Microscopía de barrido láser confocal

La microscopía de barrido láser confocal (CLSM) fue utilizada a lo largo de la Tesis para observar la arquitectura de los biofilms y el efecto de diferentes tratamientos. Para ello se utilizaron placas con fondo de vidrio (WillCo-dish; WillCo Wells B. V., Holanda) donde se inoculó 2 ml del cultivo bacteriano y se incubaron el tiempo y temperatura correspondiente a cada bacteria, descritos en los apartados anteriores. También se usaron las placas de fondo de vidrio de Ibidi  $\mu$ -Slide 4 well y 8 well (ibidi; ibidi GmbH, Alemania) donde se inocularon 600 y 300  $\mu$ l respectivamente. A continuación, los biofilms se trataron (o no) con distintos compuestos para ver su efecto. El medio de cultivo se retiró y el biofilm se lavó con CpH8 y se tiñeron con el fluorocromo, la lectina o el compuesto o kit correspondiente. Los biofilms se observaron utilizando el microscopio Leica TCS-SP5-AOBS-UV CLSM y el objetivo 63x (HCX PL APO CS 63x/1.4). Las imágenes se adquirieron en un formato 512x512 a 700 Hz. Las imágenes se analizaron mediante el software de Leica LCS. Se obtuvieron las proyecciones de los planos x–y (imágenes individuales a intervalos de 0.5  $\mu$ m) y x–z (imágenes a intervalos de 5  $\mu$ m).

## 7. ENSAYOS DE DEPOSICIÓN DEL COMPONENTE C3

Para el análisis del depósito del componente C3 del complemento se siguió el método descrito por Brown y cols. (2002) utilizando citometría de flujo. En el caso de *S. pneumoniae* se siguió la metodología previamente mencionada, mientras que para comparar el depósito de C3 en el planctónico frente al biofilm en *S. aureus* se adaptó el protocolo. Para ello se realizó un cultivo de *S. aureus* en medio TSBGY a 37°C hasta una  $A_{550}$  de 0.5–0.6. Se realizó una dilución 1/100 en medio TSBGY para el cultivo planctónico y otra para inocular 200  $\mu$ l por pocillo en una placa de 96 pocillos para permitir la formación de biofilm. Ambos cultivos se incubaron durante 24 h a 37°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación, el cultivo planctónico se concentró para tener una concentración de UFC/ml similar a la del biofilm ( $\approx 2 \times 10^9$  UFC/ml). En el caso del biofilm se retiró el cultivo planctónico, se lavó y resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón SP. Se enfrentaron 20  $\mu$ l de biofilm o 20  $\mu$ l de cultivo planctónico concentrado a 10  $\mu$ l de suero humano diluido 1/5 o tampón SP, en el caso de los controles. Se incubaron a 37°C durante 20 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13200 rpm a 4°C durante 10 min y el sedimento se lavó con 300  $\mu$ l de tampón SP-Tween 20 (0.1%). Se añadieron 50  $\mu$ l de una dilución 1/500 del C3b-FITC (**Tabla 6**) y se incubó 30 min en hielo y oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó y lavó de nuevo. Finalmente, el sedimento se resuspendió en una solución al 3% de paraformaldehído y se completó el volumen hasta 250  $\mu$ l con tampón SP. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson).

## 8. OPSONOFAGOCITOSIS

Para los experimentos de opsonofagocitosis se utilizó la línea celular HL-60 obtenida a partir de un paciente con leucemia promielocítica humana (CCL-240; ATCC) diferenciada a neutrófilos. La diferenciación granulocítica inducida por *N, N*-dimetilformamida origina células que expresan los mismos receptores que los neutrófilos polimorfonucleares humanos (Romero-Steiner *et al.*, 1997). El estado de diferenciación de las células fue confirmado antes de los ensayos usando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Las células diferenciadas se lavaron dos veces con *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  pero suplementado con 0.2% de BSA) y un lavado adicional con HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  suplementado con 0.2% de BSA. Para realizar el recuento de células viables se utilizó una

cámara de Neubauer y se tiñeron las células con azul tripán. Se visualizó la proporción de células viables y sólo se realizaron los experimentos cuando la viabilidad celular era superior al 95%. Las células se mantuvieron a 0-4°C hasta su utilización.

Todos los ensayos se realizaron por muerte bacteriana en placas multipocillo de poliestireno de fondo redondo (Nunclon Delta Surface; Thermo Fisher Scientific), basados en el recuento de bacterias viables.

### **8.1. Oponofagocitosis de cultivos planctónicos de *S. pneumoniae* y *S. aureus***

En este caso se utilizaron las cepas conservadas en glicerol directamente, ya tituladas. Para la oponofagocitosis se utilizaron 10 µl de la suspensión bacteriana a una concentración de  $2.5 \times 10^4$  UFC/ml, y se pusieron en contacto con 10 µl de suero de conejo (como fuente de complemento) a una concentración de 1/5 durante 20 min a 37°C con agitación (150 rpm). Después del depósito del complemento sobre las células, se enfrentaron las bacterias a 40 µl de fagocitos HL-60 a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo, quedando una proporción de 400 células/bacteria (multiplicidad de infección (MDI) 400:1). Se incubaron durante 45 min a 37°C con una agitación de 150 rpm. Una vez enfrentada la bacteria a los neutrófilos, se sembraron 20 µl de cada pocillo en placas de agar sangre y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> 24 h para su posterior recuento de viables.

Para *S. aureus* se empleó el mismo protocolo, pero utilizándose siempre cultivo fresco. Brevemente, se cultivaron las cepas correspondientes en medio TSBGY a 37°C hasta una  $A_{550}$  de 0.5-0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio TSBGY y se incubaron durante 24 h a 37°C en agitación. De aquí se hacen las diluciones para utilizar 10 µl de la suspensión bacteriana a una concentración de  $2.5 \times 10^4$  UFC/ml.

### **8.2. Oponofagocitosis de biofilms de *S. pneumoniae* y *S. aureus***

Se cultivaron las cepas correspondientes en medio C+Y a 37°C hasta una  $A_{550}$  de 0.5-0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio C+Y. A continuación, las placas se inocularon con 200 µl por

pocillo y se incubaron durante 5 h a 34°C. Se retiró el cultivo planctónico, se realizó un lavado con agua destilada estéril y se resuspendió el biofilm en 100 µl de tampón SP estéril. Se realizó un banco de diluciones hasta conseguir la necesaria para obtener una relación MDI 400:1. Posteriormente se pusieron en contacto con 10 µl de suero de conejo (como fuente de complemento) a una concentración de 1/5 durante 20 min a 37°C con agitación de 150 rpm. Después del depósito del complemento sobre las células, se enfrentaron estas a 40 µl de fagocitos HL-60 a una concentración de 10<sup>5</sup> células/pocillo quedando la MDI 400:1 y se incubaron durante 45 min a 37°C con una agitación de 150 rpm. Una vez enfrentada la bacteria a los neutrófilos, se sembraron 20 µl de cada pocillo en una placa de agar sangre y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> 24 h para su posterior recuento de viables.

Para *S. aureus* se utilizó el mismo protocolo, pero incubando las cepas de manera diferente. Brevemente, se cultivaron las cepas correspondientes en medio TSBGY a 37°C hasta una A<sub>550</sub> de 0.5-0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en el mismo medio. A continuación, las placas se inocularon con 200 µl por pocillo y se incubaron durante 24 h a 37°C. Con el biofilm ya formado, se retiró el cultivo planctónico y se resuspendió en tampón SP estéril como indicamos arriba.

### **8.3. Fagocitosis mediada por el receptor PSGL-1**

Para analizar la función del receptor PSGL-1 en el reconocimiento de los diferentes serotipos de neumococo y de *S. aureus* se utilizó la metodología previamente descrita (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). La preparación de cultivos bacterianos se realizó como se describe en los apartados 8.1 y 8.3, la diferencia es que se utilizaba el anticuerpo KPL-1 para bloquear el receptor de las células HL-60. Estas células se incubaron durante 1 h a 37°C con 25 mg/ml de dicho anticuerpo o un control de isotipo IgG. La interacción bacteria-célula se realizó como se describe arriba, utilizando una MDI 400:1 usando un grupo de células HL-60 con el receptor PSGL-1 bloqueado y un grupo de células HL-60 control incubadas con el control de isotipo. Una vez enfrentada la bacteria a los neutrófilos, se sembraron 20 µl de cada pocillo en placas de agar sangre o TSA y se incubaron a 37°C con o sin 5% de CO<sub>2</sub> 24 h para un posterior recuento de viables.

#### **8.4. Opsonofagocitosis de biofilms de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y biofilms mixtos *S. aureus*–*S. pneumoniae* con sueros pre y post VCN13**

Primero se realizó una titulación o determinación de los anticuerpos funcionales de los sueros utilizados. El título se define como la dilución de suero que produce una reducción del 50% de las UFC por fagocitosis mediada por el complemento siguiendo las recomendaciones internacionales (Nahm *et al.*, 2000). Para ello se utilizaron 10  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas de los diferentes serotipos en una concentración de  $2.5 \times 10^4$  UFC/ml, y se pusieron en contacto con 10  $\mu$ l de las diferentes diluciones de los sueros pre y post VCN13 inactivado durante 20 min a 37°C con agitación de 150 rpm. Después del depósito de los anticuerpos sobre las células, se enfrentaron las bacterias a 10  $\mu$ l de suero de conejo a una concentración 1/5 que sirvió como fuente de complemento y a 40  $\mu$ l de fagocitos HL-60 a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo, quedando una MDI 400:1. Se incubaron durante 45 min a 37°C con una agitación de 150 rpm. Una vez enfrentada la bacteria a los neutrófilos, se sembraron 20  $\mu$ l de cada pocillo en una placa de agar sangre y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> 24 h para un posterior recuento de viables.

Después, estos sueros se utilizarán para la fagocitosis de los diferentes biofilms a probar. Para esto los diferentes biofilms de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y biofilm mixto se incubaron en las condiciones descritas en los apartados anteriores. Posteriormente se retiró el cultivo planctónico, se realizó un lavado con agua destilada estéril y se resuspendieron los biofilms en 100  $\mu$ l de tampón SP estéril. Se realizó un banco de diluciones hasta conseguir la concentración necesaria para obtener una relación MDI 400:1. A continuación, se pusieron en contacto con 10  $\mu$ l de suero pre o post VCN13 inactivado a una concentración de 1/5 durante 20 min a 37°C con agitación (150 rpm). Después del depósito de anticuerpos sobre las células, se enfrentaron las bacterias a 10  $\mu$ l de suero de conejo a una concentración 1/5 que sirvió como fuente de complemento y 40  $\mu$ l de fagocitos HL-60 a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo quedando la MDI 400:1 y se incubaron durante 45 minutos a 37°C en agitación (150 rpm). Una vez enfrentadas las bacterias a los neutrófilos, se sembraron 20  $\mu$ l de cada pocillo en una placa de agar sangre, agar sangre con gentamicina, manitol sal o TSA y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> o 37°C 24 h para su posterior recuento.

## 9. MODELOS ANIMALES

Todos los procedimientos científicos con animales de experimentación se realizaron según el Real Decreto 53/2013 (ECC/566/2015) y las regulaciones de la Unión Europea (2010/63/EU). Todos los procedimientos siguieron las guías y protocolos aprobados por el Comité de Ética Animal del ISCIII y la Comunidad de Madrid (CBA PA 52-2011-v2 y PROEX 218/15 y PROEX 063.1/21). Los animales fueron criados en el animalario del CNM (ISCIII). Se utilizaron ratones macho C57BL/6 que pesaban alrededor de 20 g.

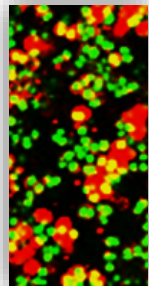
Para evaluar la patogénesis de los serotipos emergentes 22F y 33F se realizó un modelo de sepsis inoculando  $2 \times 10^7$  UFC/ratón por vía intraperitoneal de las cepas descritas en la **Tabla 2**: P244, P017, 1407/18, 1000/18, 1833/18 y 1950/18. Para evaluar la concentración de bacterias en sangre tras 24 h, se obtuvo la muestra a partir de la vena de la cola. Se realizó un banco de diluciones de la sangre extraída, se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> 24 h para su posterior recuento. El umbral de detección fue de 10<sup>2</sup> UFC/ml. Además, se realizaron curvas de supervivencia tras 7 días de seguimiento tras la infección que se analizaron mediante el test log-rank (Mantel-Cox) usando el programa GraphPad Prism 8.0.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

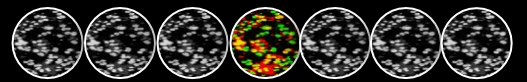
Los datos mostrados a lo largo de la Tesis Doctoral son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Además, cada dato muestra la media y desviación estándar (DS) de 3-6 réplicas. Para el análisis estadístico se empleó la *t* de Student de dos colas usando el programa GraphPad Prism 8.0. Para las comparaciones múltiples se usó un análisis de varianza (ANOVA) más un test post hoc Dunnett. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con una \**P* < 0.05 y muy significativas con valores \*\**P* < 0.01 y \*\*\* *P* < 0.001.

Los datos de incidencia fueron calculados considerando el número de casos dividido por la población usando los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE). Las

tendencias de los serotipos fueron obtenidas calculado los datos de la situación actual versus los de diferentes periodos usando el índice relativo de incidencia (IRR) con intervalos de confianza del 95% usando modelos de regresión de Poisson.



## IV. RESULTADOS





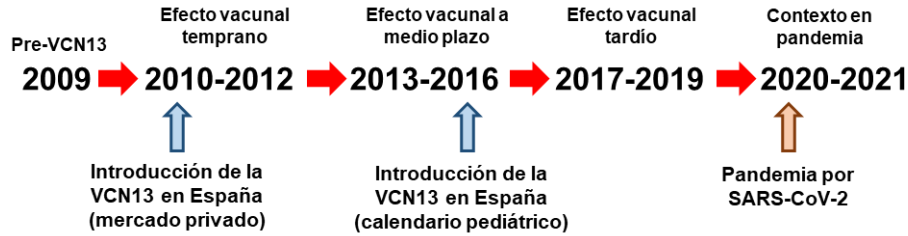
## **1. RELEVANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LOS SEROTIPOS 22F Y 33F INCLUIDOS EN LAS NUEVAS VACUNAS NEUMOCÓCICAS CONJUGADAS**

La mejor estrategia para combatir las infecciones por *S. pneumoniae*, y específicamente la ENI, es la aplicación de medidas profilácticas basadas en la administración de vacunas antineumocócicas en niños y adultos (Moore *et al.*, 2015, Wahl *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020). En España se utilizan: la vacuna VCN13 en población pediátrica a nivel nacional y, en población adulta, hay CCAA que utilizan esta vacuna mientras que otras CCAA siguen la recomendación del Ministerio de Sanidad y utilizan la vacuna VNP23 (Redondo *et al.*, 2019). La VCN13 ha mostrado su efectividad tanto en niños como adultos vacunados directamente en la prevención de la neumonía y la ENI (Bonten *et al.*, 2015, Moore *et al.*, 2015, McLaughlin *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020), pero también ha mostrado efecto rebaño o de inmunidad indirecta en población adulta gracias a la vacunación pediátrica (Mackenzie *et al.*, 2016). La VNP23 previene la ENI pero tiene poco efecto frente a la neumonía en adultos (Huss *et al.*, 2009, Andrews *et al.*, 2012, Russell *et al.*, 2015). La principal limitación de las vacunas conjugadas es el fenómeno denominado reemplazo de serotipos, debido a la variabilidad antigénica de neumococo con hasta 101 serotipos descritos hasta la fecha y la emergencia de clones virulentos que evaden la vacuna al modificar la cápsula (Brueggemann *et al.*, 2007, Weinberger *et al.*, 2011). Este fenómeno se puede contrarrestar con el desarrollo de vacunas que incluyan más serotipos, como las nuevas VCN15 y VCN20 (Greenberg *et al.*, 2018, Thompson *et al.*, 2019). Los serotipos 22F y 33F se encuentran entre los serotipos adicionales incluidos en estas recientes vacunas conjugadas, por lo que tanto su impacto en la ENI en España como su papel en patogénesis son los principales objetivos de estudio de este capítulo.

### **1.1. Evolución de la enfermedad neumocócica invasiva producida por los serotipos 22F y 33F en España en el periodo 2009-2021: impacto del SARS-CoV-2**

En primer lugar, se evaluó la situación epidemiológica de casos de ENI por los serotipos 22F y 33F durante los últimos 13 años. En este periodo se contempla el año previo a la introducción de la VCN13 (2009), el efecto temprano de la VCN13 tras su introducción en 2010 en el mercado privado (2010-2012), el efecto a medio plazo de la VCN13 (2013-2016), el efecto tardío de la VCN13 (2017-2019) y ambos serotipos

en el contexto de la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 (2020-2021) (**Figura 10**).



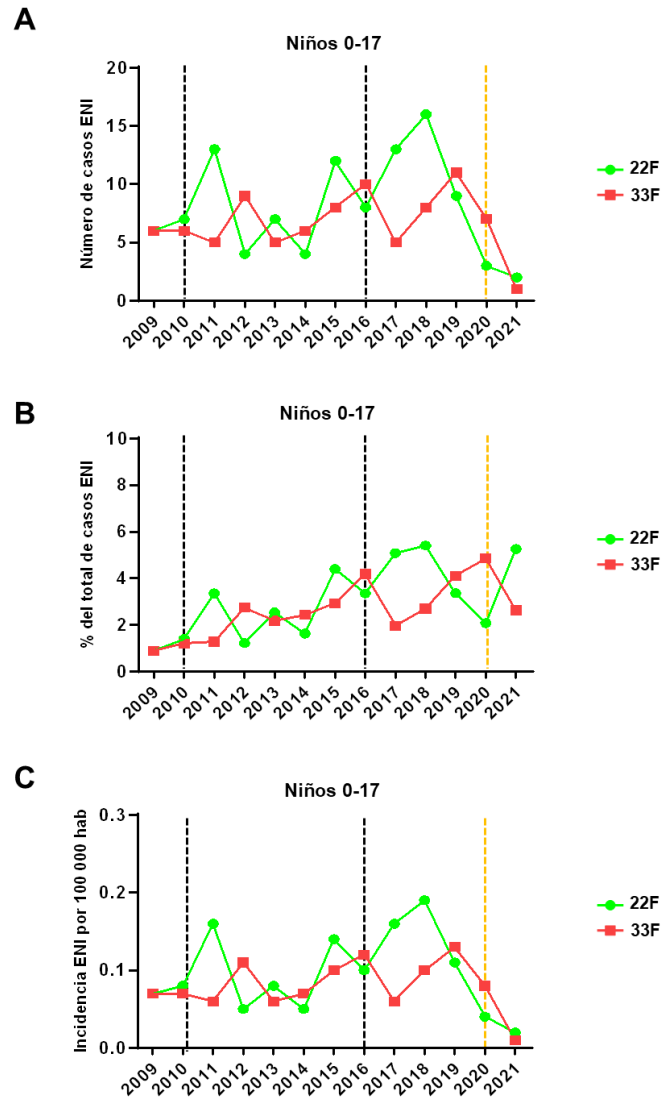
**Figura 10.** Esquema de los años evaluados para analizar el impacto de los serotipos 22F y 33F en la ENI en España.

Los datos muestran los casos totales, la proporción de los serotipos 22F y 33F en función de los casos totales de ENI y las incidencias de ambos serotipos (**Figura 11**). El año 2021 contiene los casos notificados durante el primer semestre, teniendo en cuenta que la gran mayoría de muestras suelen llegar en el primer trimestre del año coincidiendo con el periodo invernal y la mayor incidencia de gripe. Las incidencias se calcularon considerando el número de casos dividido por la población usando los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE).

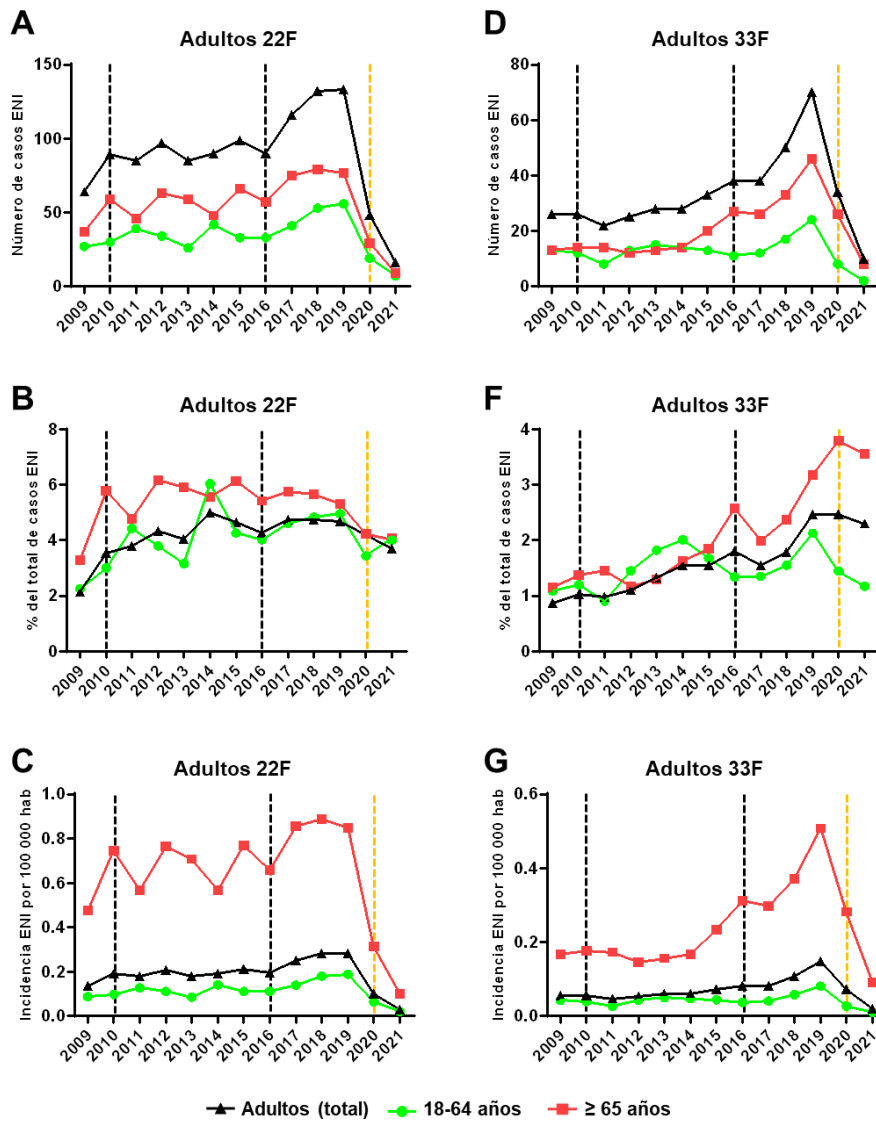
Los casos de ENI producidos por el serotipo 22F en población pediátrica mostraron una tendencia similar hasta 2016 (6 casos en 2009 vs. 8 casos en 2016), año en el que se introdujo la vacuna en el calendario pediátrico nacional (**Figura 11A**). A partir de 2016 se observa un crecimiento continuado alcanzando 16 casos en 2018, con una disminución en 2019 y, posteriormente, una caída acentuada tanto del número de casos como en la incidencia debido a la pandemia por SARS-CoV 2, aunque es importante matizar que el año 2021 representa únicamente los casos del primer semestre (**Figura 11A y C**). En la población pediátrica, el aumento de casos de ENI por estos serotipos se ve reflejado cuando se analizan los porcentajes, que suben del 0.89% en 2009 hasta llegar al máximo en 2018, siendo un 5.4% de los casos de ENI en la población de 0-17 años (**Figura 11B**). A pesar de la disminución del número de casos y la incidencia del serotipo 22F en la población pediátrica durante el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2, la proporción del total de casos de ENI por este serotipo se mantiene estable (**Figura 11B**).

En el caso del serotipo 33F, el aumento de casos de ENI en la población pediátrica ha sido más moderado pasando de 6 casos de 2009 a 8-11 casos en 2018–2019 (**Figura 11A**). Aunque el aumento en el número de casos e incidencia por el serotipo 33F pueda parecer poco llamativo (**Figura 11A y C**), la proporción de casos por este serotipo sí que ha aumentado en la población pediátrica subiendo del 0.89% en 2009 a representar un 4.1% en 2019 (**Figura 11B**). Como en el caso del serotipo 22F, a pesar de la disminución del número de casos y la incidencia del serotipo 33F en la población pediátrica, la proporción del total de casos de ENI por este serotipo se mantiene estable, incluso durante el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2 (**Figura 11B**).

En la población adulta también se puede observar como, a partir de 2010, los casos de ENI producidos por el serotipo 22F aumentaron tanto en la población total de adultos (64 casos en 2009 a 133 casos en 2019), como en los grupos de edad de 18-64 años (27 casos en 2009 a 56 casos en 2019) y  $\geq 65$  años (37 casos en 2009 a 77 casos en 2019) (**Figura 12A**). Este incremento se dispara entre 2016 y 2019 donde los casos en ambos grupos de edad aumentan de forma muy marcada (**Figura 12A**). Esta misma tendencia se ve reflejada en las tasas de incidencia, donde el aumento del serotipo 22F en el grupo de edad  $\geq 65$  años es el más destacable (**Figura 12C**). La proporción de casos del serotipo 22F respecto al total de casos de ENI en adultos también aumentó, aunque a partir de 2014-2016 la situación de este serotipo parece estabilizarse (**Figura 12B**). Como ya se observó previamente en la población pediátrica, a pesar de que tanto el número de casos como la incidencia de ENI por el serotipo 22F sufre una caída en los años 2020-2021 debido al SARS-CoV-2, el porcentaje de casos de ENI por este serotipo no disminuyó (**Figura 12B**). Respecto al serotipo 33F, su aumento en la población adulta es aún más brusco (aumentando de 26 casos en población adulta total en 2009 a 70 casos en 2019), presentando un ligero ascenso en el número de casos de ENI desde 2010 y luego un incremento importante durante 2016–2019 (**Figura 12D**). Esto se ve acompañado por un aumento de hasta 3 veces en las tasas de incidencia, sobre todo en el grupo de  $\geq 65$  años (3.18 por 100 000 habitantes en 2019 vs. 1.16 por 100 000 habitantes en 2009) (**Figura 12G**). A pesar de los casi dos años de pandemia por SARS-CoV-2, el porcentaje de casos de ENI producidos por el serotipo 33F respecto al total de casos, no sólo no ha disminuido, sino que ha aumentado en el grupo de edad de  $\geq 65$  años, manteniéndose estable en el grupo de 18-64 años (**Figura 12F**).



**Figura 11.** Evolución de los serotipos 22F y 33F produciendo ENI en población pediátrica durante el periodo 2009-2021. **(A)** Número de casos de ENI de ambos serotipos. **(B)** Proporción de casos de ENI de ambos serotipos en función del total de casos de ENI en población pediátrica. **(C)** Incidencia de casos de ENI por 100 000 habitantes de ambos serotipos. Las líneas verdes con círculos representan la evolución del serotipo 22F y las rojas con cuadrados representan la evolución del serotipo 33F. La primera línea negra discontinua representa la introducción de la VCN13 en el mercado privado (año 2010), la segunda representa la introducción de la VCN13 en el calendario pediátrico (año 2016) y la línea amarilla discontinua representa el inicio de la pandemia por SARS-CoV-2.



**Figura 12.** Evolución de los serotipos 22F y 33F produciendo ENI en población adulta durante el periodo 2009-2021. (A y D) Número de casos de ENI de ambos serotipos. (B y E) Proporción de casos ENI de ambos serotipos en función del total de casos de ENI en la población adulta. (C y F) Incidencia de casos de ENI por 100 000 habitantes de ambos serotipos. La línea negra con triángulos representa el total de los adultos, las líneas verdes con círculos representan adultos entre 18 y 64 años y las líneas rojas con cuadrados representan adultos  $\geq 65$  años. La primera línea negra discontinua representa la introducción de la VCN13 en el mercado privado (año 2010), la segunda representa la introducción de la VCN13 en el calendario pediátrico (año 2016) y la línea amarilla discontinua representa el inicio de la pandemia por SARS-CoV-2.

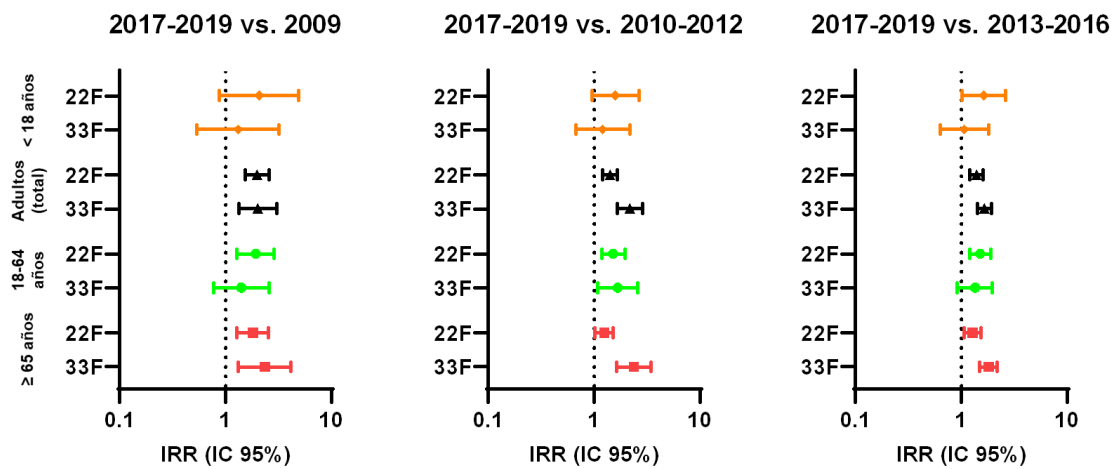
Se analizaron estadísticamente los datos mediante la obtención de la razón de tasas de incidencia (IRR, *incidence rate ratio*), comparando diferentes periodos para ver el impacto de la vacunación. Para ello se estudió el efecto vacunal tardío (2017-2019) vs. el efecto vacunal a medio plazo (2013-2016), el efecto vacunal temprano (2010-2012) y la era pre-VCN13 (2009). Los valores de IRR por encima de 1 indican que la vacunación ha tenido impacto aumentando las tasas de incidencia, mientras que los IRR por debajo de 1 indican que la vacunación ha tenido impacto disminuyendo esas tasas de incidencia. Para que el aumento o la disminución sean significativos, el intervalo de confianza (IC) del 95% no tiene que incluir el valor de 1.

En la población pediátrica, los IRRs del serotipo 22F mostraron una tendencia ascendente, aunque sólo fue significativa cuando se compararon con el efecto vacunal a medio plazo (para el periodo 2017-2019 vs. 2009, IRR 2.06; IC 95% 0.88-4.93, para el periodo 2017-2019 vs. 2010-2012, IRR 1.59; IC 95% 0.95-2.65 y para periodo 2017-2019 vs. 2013-2016, IRR 1.64; IC 95% 1.02-2.64) (**Tabla 7 y Figura 13**). En relación al serotipo 33F, los IRRs muestran que la situación de este serotipo en la ENI pediátrica es relativamente más estable desde la introducción de la VCN13 (para el periodo 2017-2019 vs. 2009, IRR 1.32; IC 95% 0.54-3.22, para el periodo 2017-2019 vs. 2010-2012, IRR 1.29; IC 95% 0.67-2.18 y para el periodo 2017-2019 vs. 2013-2016, IRR 1.07; IC 95% 0.63-1.83) (**Tabla 7 y Figura 13**).

En adultos de todas las edades (total), cuando se compararon los diferentes periodos, se observó un claro y significativo ascenso en los valores IRR de ambos serotipos (**Tabla 7 y Figura 13**). Tanto en el serotipo 22F (para el periodo 2017-2019 vs. 2009, IRR 1.99; IC 95% 1.53-2.59, para el periodo 2017-2019 vs. 2010-2012, IRR 1.42; IC 95% 1.21-1.66 y para el periodo 2017-2019 vs. 2013-2016, IRR 1.39; IC 95% 1.21-1.61) como en el serotipo 33F (para el periodo 2017-2019 vs. 2009, IRR 2.03; IC 95% 1.34-3.07, para el periodo 2017-2019 vs. 2010-2012, IRR 2.18; IC 95% 1.66-2.88 y para el periodo 2017-2019 vs. 2013-2016, IRR 1.66; IC 95% 1.42-1.94) hay una clara tendencia ascendente de casos desde el 2009 hasta el 2019, siendo mayor en el caso del serotipo 33F (**Tabla 7 y Figura 13**). Este aumento se da en ambos grupos de edad, destacando el mayor aumento del serotipo 22F en el rango de 18-64 años y significativo en todos los periodos, siendo para el serotipo 22F el IRR 2017-2019 vs. 2009 de 1.93; IC 95% 1.28-2.9 y no significativo para el serotipo 33F con un IRR 2017-2019 vs. 2009 de 1.41; IC 95% 0.77-2.59 (**Tabla 7 y Figura 13**). Mientras que

en adultos  $\geq 65$  años se aprecia un aumento de ambos serotipos de manera significativa, pero en este grupo de edad el mayor aumento tiene lugar en el serotipo 33F con un IRR 2017-2019 vs. 2009 de 2.35; IC 95% 1.32-4.18 que el del serotipo 22F con un IRR 2017-2019 vs. 2009 de 1.82; IC 95% 1.28-2.57.

En general, estos resultados indican que el uso de la vacuna VNC13 en la población pediátrica no ha tenido un impacto negativo en los serotipos 22F y 33F, mientras que, sobre todo en la población adulta, indican la existencia del fenómeno de reemplazo de serotipos.



**Figura 13.** Representación de los IRRs de los serotipos 22F y 33F comparando el periodo 2017-2019 frente a los periodos vacunales previos. Los rombos amarillos representan la población pediátrica <18 años, los triángulos negros representan la población adulta (total), los círculos verdes representan la población adulta de 18 a 64 años y los cuadrados rojos representan la población adulta  $\geq 65$  años. IRR, razón de tasas; IC, intervalo de confianza.

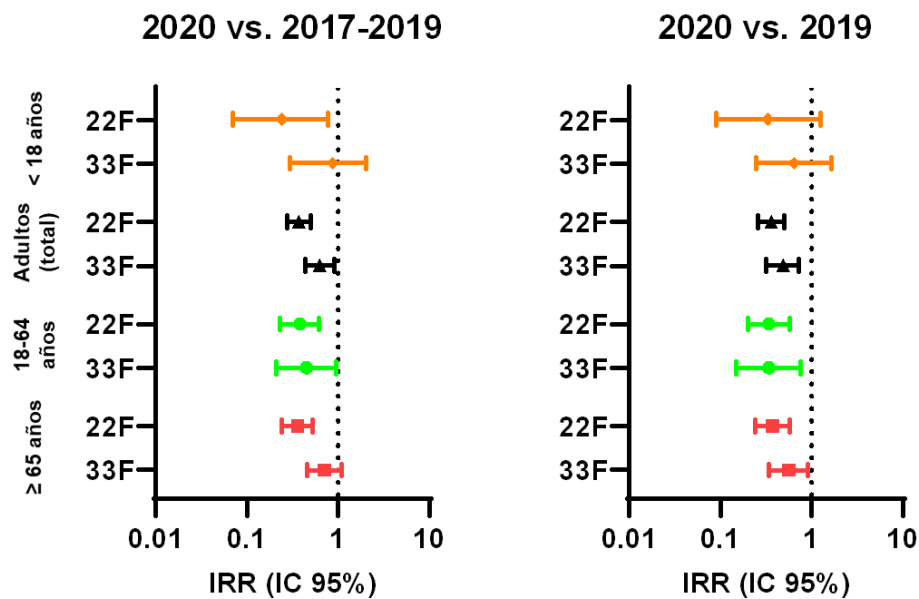
**Tabla 7.** IRRs de los serotipos 22F y 33F en todos los grupos de edad comparando el periodo de efecto vacunal tardío (2017-2019) versus periodos anteriores. IRR, razón de tasas; IC, intervalo de confianza.

|                        | 2009                   |                             | 2010-2012                  |                             | 2013-2016                       |                             | 2017-2019                |                             | IRR 2017-19<br>vs. 2009 | IC 95%    | IRR 2017-19<br>vs. 2010-12 | IC 95%    | IRR 2017-19<br>vs. 2013-16 | IC 95%    |
|------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
|                        | Pre- VCN13             |                             | Efecto vacunal<br>temprano |                             | Efecto vacunal a medio<br>plazo |                             | Efecto vacunal<br>tardío |                             |                         |           |                            |           |                            |           |
|                        | casos                  | incidencia (por<br>100 000) | casos                      | incidencia (por<br>100 000) | casos                           | incidencia (por<br>100 000) | casos                    | incidencia (por<br>100 000) |                         |           |                            |           |                            |           |
| <b>&lt;18 años</b>     | <b>&lt;18 años</b>     |                             |                            |                             |                                 |                             |                          |                             |                         |           |                            |           |                            |           |
| 22F                    | 6                      | 0.07                        | 24                         | 0.10                        | 31                              | 0.09                        | 38                       | 0.15                        | 2.08                    | 0.88-4.93 | 1.59                       | 0.95-2.65 | <b>1.64</b>                | 1.02-2.64 |
| 33F                    | 6                      | 0.07                        | 20                         | 0.08                        | 30                              | 0.09                        | 24                       | 0.10                        | 1.32                    | 0.54-3.22 | 1.20                       | 0.67-2.18 | 1.07                       | 0.63-1.83 |
| <b>Adultos (total)</b> | <b>Adultos (total)</b> |                             |                            |                             |                                 |                             |                          |                             |                         |           |                            |           |                            |           |
| 22F                    | 64                     | 0.17                        | 271                        | 0.23                        | 364                             | 0.24                        | 381                      | 0.33                        | <b>1.99</b>             | 1.53-2.59 | <b>1.42</b>                | 1.21-1.66 | <b>1.39</b>                | 1.21-1.61 |
| 33F                    | 26                     | 0.07                        | 73                         | 0.06                        | 127                             | 0.08                        | 158                      | 0.14                        | <b>2.03</b>             | 1.34-3.07 | <b>2.18</b>                | 1.66-2.88 | <b>1.66</b>                | 1.42-1.94 |
| <b>18 - 64 años</b>    | <b>18 - 64 años</b>    |                             |                            |                             |                                 |                             |                          |                             |                         |           |                            |           |                            |           |
| 22F                    | 27                     | 0.09                        | 103                        | 0.11                        | 134                             | 0.11                        | 150                      | 0.17                        | <b>1.93</b>             | 1.28-2.9  | <b>1.51</b>                | 1.18-1.95 | <b>1.51</b>                | 1.2-1.91  |
| 33F                    | 13                     | 0.04                        | 33                         | 0.04                        | 53                              | 0.04                        | 53                       | 0.06                        | 1.41                    | 0.77-2.59 | <b>1.67</b>                | 1.08-2.58 | <b>1.35</b>                | 0.92-1.98 |
| <b>≥65 años</b>        | <b>≥65 años</b>        |                             |                            |                             |                                 |                             |                          |                             |                         |           |                            |           |                            |           |
| 22F                    | 37                     | 0.48                        | 168                        | 0.69                        | 230                             | 0.68                        | 231                      | 0.86                        | <b>1.82</b>             | 1.28-2.57 | <b>1.25</b>                | 1.02-1.52 | <b>1.28</b>                | 1.06-1.53 |
| 33F                    | 13                     | 0.17                        | 40                         | 0.16                        | 74                              | 0.22                        | 105                      | 0.39                        | <b>2.35</b>             | 1.32-4.18 | <b>2.38</b>                | 1.65-3.43 | <b>1.81</b>                | 1.49-2.19 |
|                        |                        |                             |                            |                             |                                 |                             |                          |                             |                         |           |                            |           |                            |           |

Por último, se decidió estudiar el impacto de la pandemia por el SARS-CoV-2 y la influencia de las diversas medidas no farmacológicas como el distanciamiento social, el uso generalizado de mascarillas, el confinamiento etc., en estos dos serotipos. Se comparó el año 2020 con el periodo vacunal tardío (2017-2019) y con el año 2019 (**Tabla 8 y Figura 14**). En población pediátrica, al comparar el año 2020 vs. el periodo 2017-2019 se observó una disminución significativa de casos ENI producidos por el serotipo 22F (IRR 0.24; IC 95% 0.07-0.77), pero no por el serotipo 33F (IRR 0.88; IC 95% 0.38-2.05). Al comparar los años 2020 vs. 2019, esta disminución no resultó significativa (para el 22F un IRR 0.33; IC 95% 0.09-1.24 y para el 33F un IRR 0.64; IC 95% 0.25-1.65) (**Tabla 8 y Figura 14**). En la población adulta, para el serotipo 22F, tanto al comparar 2020 vs. 2017-2019 como el año 2020 vs. 2019 se observaron disminuciones significativas en los valores de IRR en todos los grupos analizados (en el total de adultos para 2020 vs. 2017-2019 un IRR de 0.37; IC 95% 0.28-0.5 y para los años 2020 vs. 2019 un IRR de 0.36; IC 95% 0.26-0.5) (**Tabla 8**). En el caso del serotipo 33F también se observó una disminución en los valores IRR de todos los grupos de edad analizados, excepto para el grupo de edad de  $\geq 65$  años al comparar 2020 vs. 2017-2019 (IRR 0.71; IC 95% 0.46-1.08) (**Tabla 8**). Estos resultados demuestran que la pandemia debido al SARS-CoV-2 ha tenido un impacto epidemiológico frente a estos dos serotipos, disminuyendo su incidencia en la población adulta.

**Tabla 8.** IRRs de los serotipos 22F y 33F en todos los grupos de edad comparando el año 2020 con los años anteriores pre-SARS-CoV-2. IRR, razón de tasas; IC, intervalo de confianza.

|                        | 2017-2019                |                                  | 2019            |                                  | 2020       |                                  | IRR 2020<br>vs. 2017-<br>2019 | IC 95%    | IRR 2020<br>vs. 2019 | IC 95%    |
|------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------|----------------------|-----------|
|                        | Efecto vacunal<br>tardío |                                  | Pre- SARS-CoV-2 |                                  | SARS-CoV-2 |                                  |                               |           |                      |           |
|                        | casos                    | indicen-<br>dia (por<br>100 000) | casos           | indicen-<br>dia (por<br>100 000) | casos      | indicen-<br>dia (por<br>100 000) |                               |           |                      |           |
| <b>&lt;18 años</b>     |                          |                                  |                 |                                  |            |                                  | <b>&lt;18 años</b>            |           |                      |           |
| 22F                    | 38                       | 0.15                             | 9               | 0.11                             | 3          | 0.04                             | <b>0.24</b>                   | 0.07-0.77 | 0.33                 | 0.09-1.24 |
| 33F                    | 24                       | 0.10                             | 11              | 0.13                             | 7          | 0.08                             | 0.88                          | 0.38-2.05 | 0.64                 | 0.25-1.65 |
| <b>Adultos (total)</b> |                          |                                  |                 |                                  |            |                                  | <b>Adultos (total)</b>        |           |                      |           |
| 22F                    | 381                      | 0.33                             | 133             | 0.34                             | 48         | 0.12                             | <b>0.37</b>                   | 0.28-0.5  | <b>0.36</b>          | 0.19-0.59 |
| 33F                    | 158                      | 0.14                             | 70              | 0.18                             | 34         | 0.09                             | <b>0.63</b>                   | 0.44-0.92 | <b>0.49</b>          | 0.15-0.6  |
| <b>18 - 64 años</b>    |                          |                                  |                 |                                  |            |                                  | <b>18 - 64 años</b>           |           |                      |           |
| 22F                    | 150                      | 0.17                             | 56              | 0.19                             | 19         | 0.06                             | <b>0.38</b>                   | 0.23-0.61 | <b>0.34</b>          | 0.2-0.57  |
| 33F                    | 53                       | 0.06                             | 24              | 0.08                             | 8          | 0.03                             | <b>0.45</b>                   | 0.21-0.95 | <b>0.34</b>          | 0.15-0.75 |
| <b>≥65 años</b>        |                          |                                  |                 |                                  |            |                                  | <b>≥65 años</b>               |           |                      |           |
| 22F                    | 231                      | 0.86                             | 77              | 0.84                             | 29         | 0.31                             | <b>0.36</b>                   | 0.24-0.53 | <b>0.37</b>          | 0.24-0.57 |
| 33F                    | 105                      | 0.39                             | 46              | 0.50                             | 26         | 0.28                             | 0.71                          | 0.46-1.08 | <b>0.56</b>          | 0.34-0.9  |
|                        |                          |                                  |                 |                                  |            |                                  |                               |           |                      |           |



**Figura 14.** Representación de los IRRs de los serotipos 22F y 33F comparando el año 2020 con los años previos al SARS-CoV-2. Los rombos amarillos representan la población pediátrica <18 años, los triángulos negros representan la población adulta (total), los círculos verdes representan la población adulta de 18 a 64 años y los cuadrados rojos representan la población adulta ≥ 65 años. IRR, razón de tasas; IC, intervalo de confianza.

## 1.2. Análisis genético de los clones circulantes de los serotipos 22F y 33F

La diversidad genética de los aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F produciendo ENI en España se determinó mediante MLST. Se eligieron aislados del periodo vacunal tardío (2017-2019) para identificar los clones que circulaban en ese momento en el que ya se apreciaba el efecto en el reemplazo de serotipos tras la introducción de la VCN13. En la **Tabla 9** se puede observar que el serotipo 22F estaba representado por un total de cinco secuencitipos (ST), agrupados en tres complejos clonales (CC). El secuencitipo más frecuente de este serotipo fue el ST433 con un 53% de los aislados, seguido del ST1369 y ST7314 con un 12.5% cada uno (**Tabla 9**). Además, había dos genotipos agrupados en el CC433 representando un 71% de

los aislados clínicos de 22F (**Tabla 9**). El serotipo 33F también tenía cinco ST diferentes, siendo el principal representante el ST717 formado por el 71% de las cepas, seguido del ST13320 con un 18% de las cepas (**Tabla 9**). Además, el 93% de los aislados pertenecen al CC717, confirmando que es un serotipo mucho más clonal que el 22F (**Tabla 9**). En resumen, los aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F que producen ENI en la población española parecen conservados, siendo los ST433<sup>22F</sup> y ST717<sup>33F</sup> los más prevalentes.

**Tabla 9.** Distribución genotípica de los aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F del año 2018.

| Serotipo/ CC/ ST <sup>a</sup> | Número de aislados | Porcentaje del total (%) |
|-------------------------------|--------------------|--------------------------|
| <b>Serotipo 22F</b>           | <b>24</b>          |                          |
| CC433                         | 17                 | 70,83                    |
| ST433                         | 14                 | 58,33                    |
| ST7314                        | 3                  | 12,5                     |
| CC698                         | 5                  | 20,83                    |
| ST698                         | 2                  | 8,33                     |
| ST13692                       | 3                  | 12,5                     |
| CC1439                        | 2                  | 8,33                     |
| ST3134                        | 2                  | 8,33                     |
| <b>Serotipo 33F</b>           | <b>28</b>          |                          |
| CC717                         | 26                 | 92,86                    |
| ST717                         | 20                 | 71,43                    |
| ST13320                       | 5                  | 17,86                    |
| ST4668                        | 1                  | 3,57                     |
| CC1012                        | 1                  | 3,57                     |
| ST1012                        | 1                  | 3,57                     |
| CC433                         | 1                  | 3,57                     |
| ST7314                        | 1                  | 3,57                     |

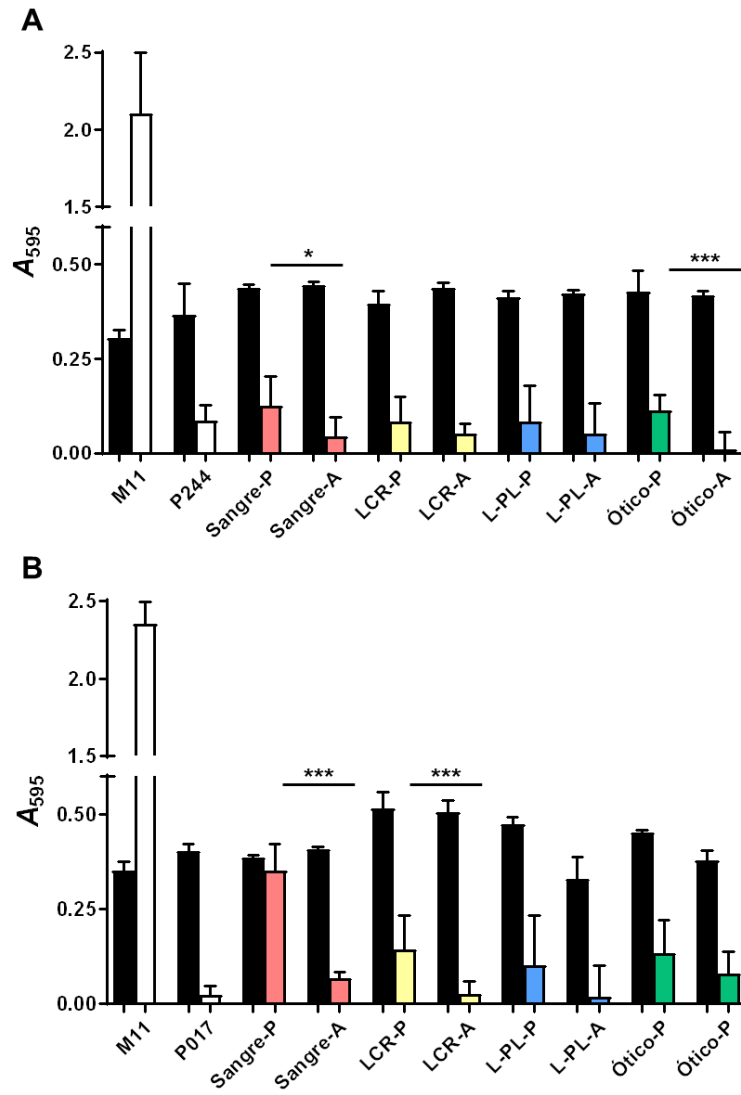
a. CC, complejo clonal; ST, secuencitipo.

### 1.3. Caracterización del biofilm de aislados circulantes de los serotipos 22F y 33F

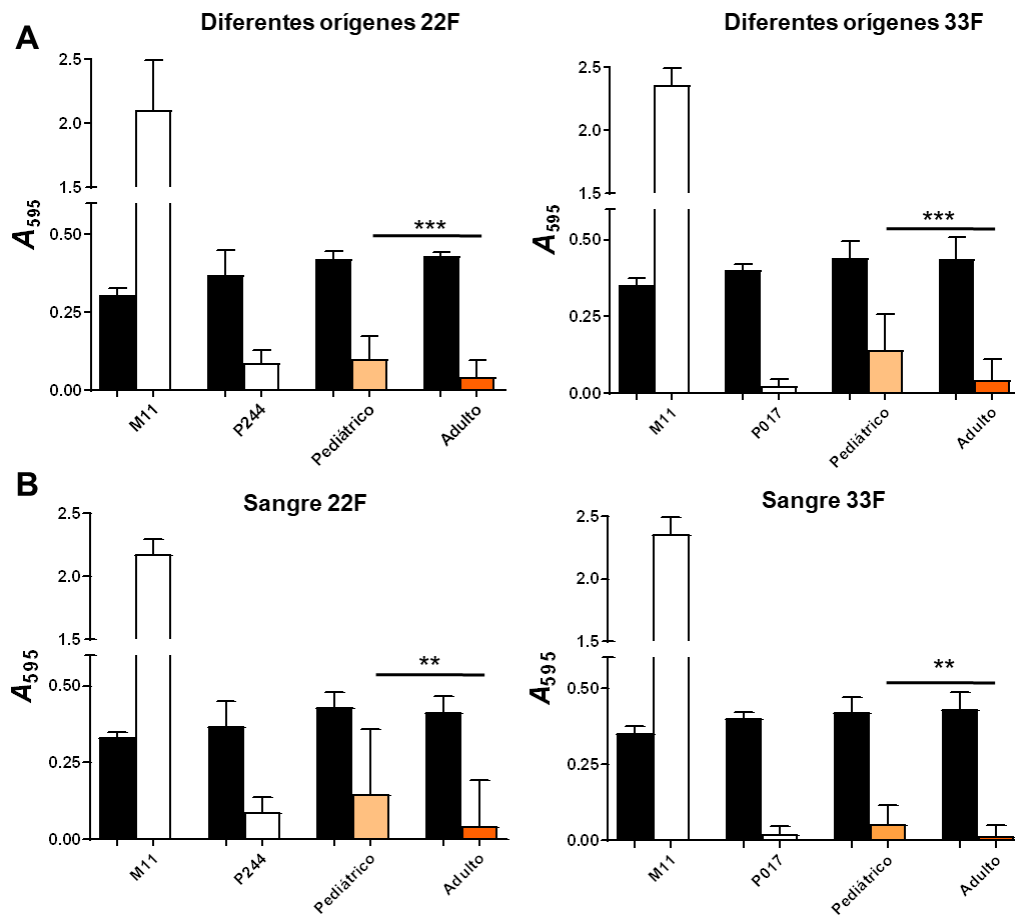
Se realizó una selección aleatorizada de diferentes aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F de diferentes orígenes para caracterizar su capacidad de formación de biofilm. Los orígenes de infección seleccionados fueron: sangre, LCR, L-PL y aislados óticos, tanto pediátricos como de adultos (excepto un aislado clínico de adulto con otitis del serotipo 33F, que no se pudo obtener). Se caracterizó la formación de biofilm de estos aislados clínicos (**Figura 15**). Para ello, se utilizaron una serie de controles de biofilm: la cepa no capsulada de *S. pneumoniae* M11 y mutantes isogénicos de los serotipos 22F y 33F, es decir, cepas de *S. pneumoniae* con el fondo genético de M11 con el CPS de los serotipos 22F (P244) o 33F (P017). Aunque tanto los mutantes isogénicos 22F y 33F, como todos los aislados clínicos, formaron menos biofilm que la cepa no capsulada M11, como era de esperar (Domenech *et al.*, 2015), se encontraron diferencias significativas en la formación de biofilm entre cepas pediátricas y de adultos independientemente del serotipo analizado (**Figura 15**). En todos los casos, los aislados clínicos pediátricos formaron mejor biofilm que los de adultos, siendo estadísticamente significativo en los aislados de sangre y otitis para el serotipo 22F (**Figura 15A**) y de sangre y LCR para el serotipo 33F (**Figura 15B**). Además, en concordancia con lo observado anteriormente, los aislados clínicos de los diferentes serotipos formaban diferentes biofilms respecto a los controles utilizados (los mutantes isogénicos 22F y 33F), confirmando de nuevo que el fondo genético, y no sólo el CPS, contribuye en la adhesión de neumococo a superficies abióticas y a la formación de biofilm (Moscoso *et al.*, 2006, Domenech *et al.*, 2014, Domenech *et al.*, 2015).

En una segunda fase se incluyeron, de manera aleatoria, 16 aislados clínicos más de población adulta y pediátrica de los serotipos 22F y 33F para determinar si se mantenía este patrón de mayor formación de biofilm en los aislados pediátricos (**Figura 16**). Al comparar globalmente todos los resultados, se observa que la formación de biofilm es mayor en aislados pediátricos ( $***P < 0.001$ , *t* de Student de dos colas) (**Figura 16A**). De forma adicional, analizando nuevos aislados clínicos de sangre pediátricos y de adultos, se observó, de nuevo, que los aislados clínicos pediátricos formaban mayor biofilm que los aislados clínicos procedentes de la población adulta (**Figura 16B**).

RESULTADOS

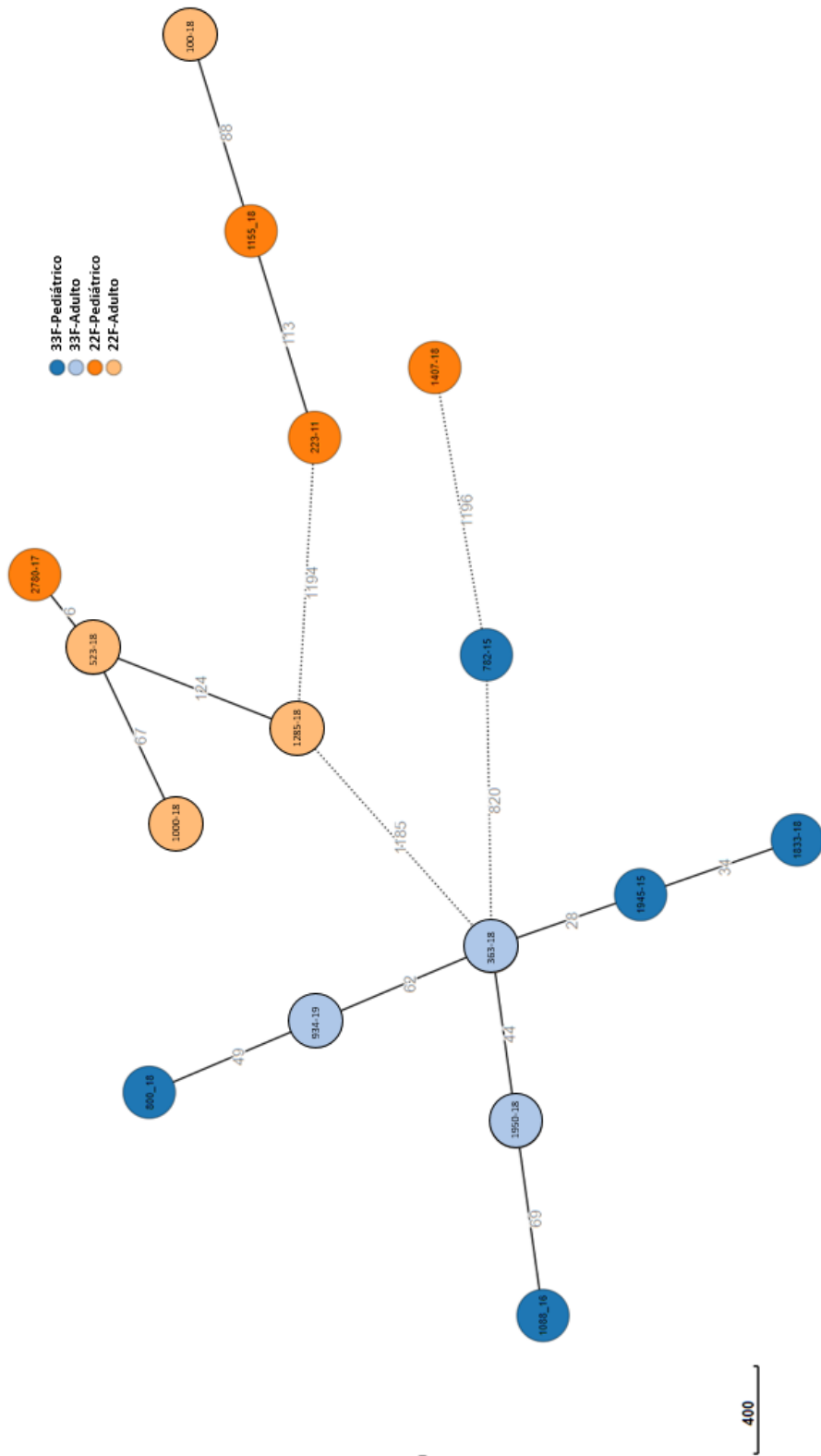


**Figura 15.** Formación de biofilm de aislados clínicos pediátricos y de adultos de cuatro orígenes diferentes. **(A)** Representa el biofilm de los aislados clínicos del serotipo 22F. **(B)** Representa el biofilm de los aislados clínicos del serotipo 33F. Las barras negras representan crecimiento, las barras blancas representan el biofilm del control no encapsulado (M11) y de los isogénicos (P244 o P017). Las barras de diferentes colores representan la formación de biofilm de los aislados clínicos según su origen. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001). M11, cepa no-encapsulada; P244, transformante isogénico 22F; P017, transformante isogénico 33F; P, pediátrico; A, adulto; LCR, líquido cefalorraquídeo; L-PL, líquido pleural.



**Figura 16.** Análisis de la formación de biofilm de aislados clínicos pediátricos y de adultos de los serotipos 22F y 33F. **(A)** Representa la comparación de biofilms de aislados pediátricos y de adultos de cuatro orígenes diferentes: 22F (izquierda) y 33F (derecha). **(B)** Representa la comparación de biofilms de aislados pediátricos y de adultos de sangre: 22F (izquierda) y 33F (derecha). Las barras negras representan crecimiento, las barras blancas representan el biofilm del control no encapsulado (M11) y de los isogénicos (P244 o P017). Las barras en naranja claro (pediátrico) y oscuro (adulto) representan la formación de biofilm de los aislados clínicos. Las barras de error representan desviación estándar y los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). M11, cepa no-encapsulada; P244, transformante isogénico 22F; P017, transformante isogénico 33F.

Estudios previos ya habían mostrado que hay serotipos con genotipos circulantes que forman diferentes niveles de biofilm (Aguinagalde *et al.*, 2015). Por ello, se intentó comparar el ST y CC con la formación de biofilm basándonos en el origen clínico aunque no se encontró una posible relación entre genotipo del aislado, la formación de biofilm y el origen de la muestra (**Tabla 2 y Figuras 15 y 16**). Debido a la limitación de genes del MLST, se realizó la secuenciación masiva de las 16 cepas pediátricas y adultas de diferentes orígenes de los serotipos 22F y 33F para analizar más en detalle la posible asociación fenotipo-genotipo (**Figura 15**). Este análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva, en el que se va a realizar una matriz de perfiles de ausencia/presencia de genes de virulencia asociados a biofilm frente al fenotipo, se está realizando en este momento, y por ello, no se ha podido incluir en la Memoria escrita de esta Tesis Doctoral aunque se mostrarían si estuvieran disponibles en la fase de defensa de la misma. A partir de los datos de secuenciación masiva lo que sí se ha obtenido es un árbol de distancias MST (*minimum spanning tree*) usando los datos de cgMLST (*core genome* MLST) creados con Chewbbaca (**Figura 17**). En este árbol no se puede observar una relación entre fenotipo (cepas pediátricas que forman mayor biofilm) y genotipo, pero sí que aporta información indicando que la mayoría de aislados clínicos de serotipo 33F (pediátricos y adultos) se encuentran agrupados y son cercanos filogenéticamente (**Figura 16**), perteneciendo todos al CC717 con los ST717 y ST13320 (**Tabla 9**). En cuanto al serotipo 22F se observan dos grupos más diferenciados. Un grupo compuesto por tres aislados de adultos (1000-18, 523-18 y 1285-18) y un aislado pediátrico (2780-17), que pertenecen al CC698 con los ST698 y ST13692 (**Figura 17**) y un grupo compuesto por dos aislados pediátricos (223-11 y 1155-18) y un aislado de adulto (100-18), perteneciendo todos al CC433, ST433 (**Figura 17 y Tabla 9**).



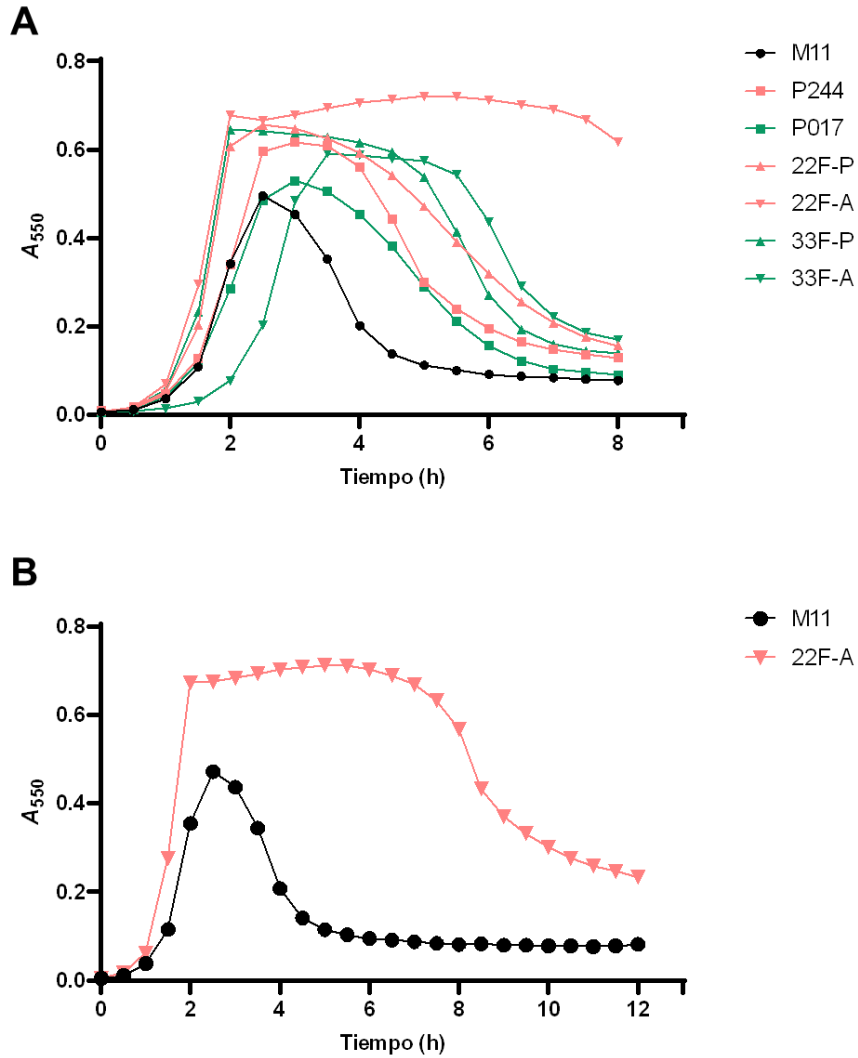
**Figura 17.** Árbol de distancias MST representado usando GrapeTree. Los datos representados pertenecen al cgMLST obtenidos por Chewbbaca, y representan las distancias en alelos de los diferentes aislados clínicos. Los círculos azules con el número de la cepa representan aislados del serotipo 33F (pediátrico oscuro, adulto claro) y los círculos naranjas con el número de la cepa representan aislados del serotipo 22F (pediátrico oscuro, adulto claro). Los números entre los círculos representa el número de alelos diferentes entre las cepas.

#### **1.4. Mecanismos de patogenicidad de aislados clínicos pediátricos y adultos de los serotipos 22F y 33F**

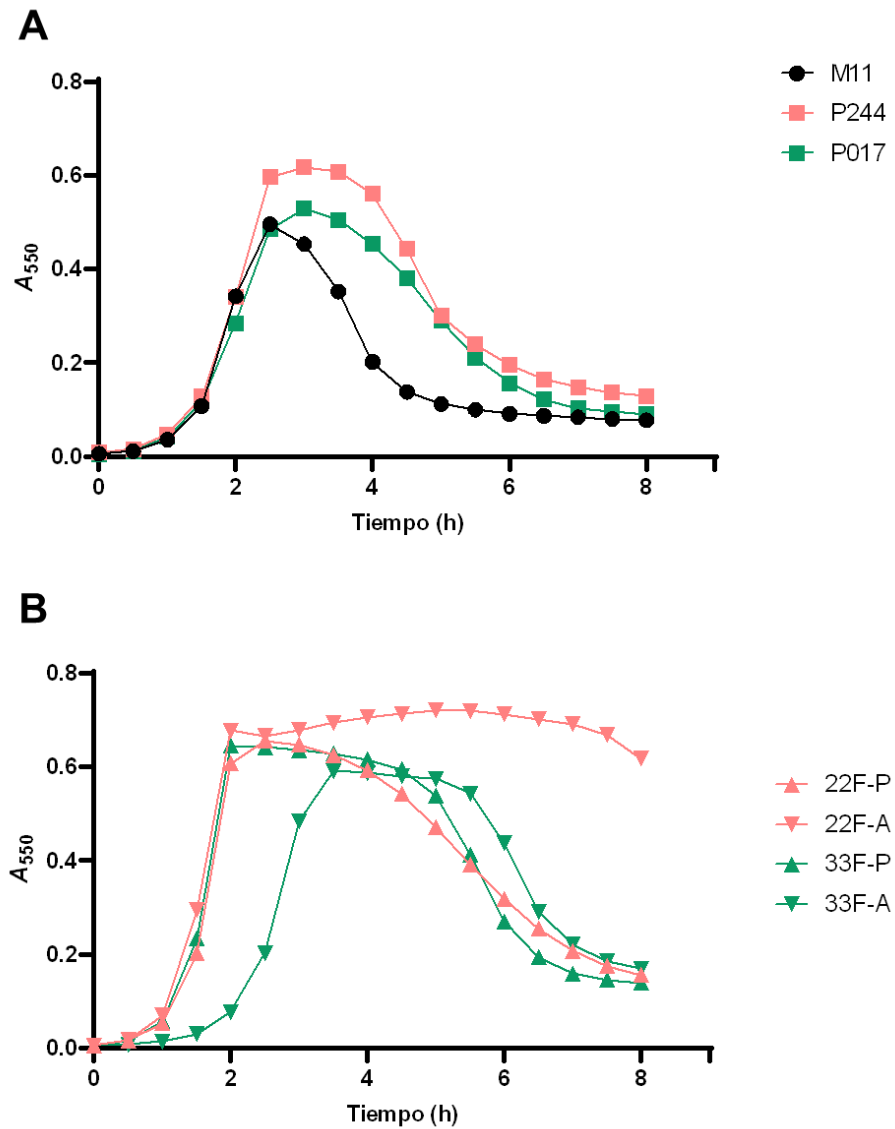
Teniendo en cuenta la diferente capacidad de formación de biofilm entre aislados pediátricos y de adultos de los serotipos 22F y 33F, sobre todo en los aislados de sangre (**Figura 15**), se decidió caracterizar estos aislados en mayor detalle. Se utilizó el control no capsulado M11, los mutantes isogénicos 22F (P244) y 33F (P017) y los aislados 22F (1407-18 Sangre/Pediátrico; 1000-18 Sangre/Adulto) y 33F (1833-18 Sangre/Pediátrico; 1950-18 Sangre/Adulto).

Lo primero que se realizó fueron las curvas de crecimiento en medio C+Y (**Figura 18**). En las **Figuras 18A y 19A** se observa cómo el control no capsulado alcanza una  $OD_{550}$  máxima de 0.5 y luego se empieza a autolisar como es esperable. Se puede apreciar que los mutantes isogénicos 22F y 33F, P244 y P017 respectivamente, empiezan la fase exponencial como la cepa M11 de la que se originan, pero alcanzan una  $OD_{550}$  más alta, siendo mayor la del 22F ( $\approx 0.6$ ) y, posteriormente, se inicia la fase de autólisis de manera simultánea (**Figura 18A**). Los aislados clínicos pediátricos 22F y 33F tienen una fase exponencial más adelantada respecto al resto de aislados y llegan a una  $OD_{550}$  máxima por encima de 0.6, lisándose de manera esperable posteriormente (**Figuras 18A y 19B**). En estas curvas destacan los aislados clínicos de adultos, concretamente, el aislado 22F adulto en una etapa temprana con una fase exponencial adelantada con una  $OD_{550}$  máxima por encima de 0.6, posee una fase estacionaria anormalmente larga (**Figuras 18A y 19B**), que es poco característica de neumococo. La curva de crecimiento de este aislado clínico 22F de adulto se analizó a tiempos más largos, viendo como comenzaba la lisis del cultivo a las 8 h (**Figura 18B**). También la curva de crecimiento del aislado 33F adulto fue inusual ya que, la fase exponencial estaba más retrasada que en el resto de cepas y aislados estudiados, aunque se lisaba de manera típica (**Figuras 18A y 19B**). Estos resultados en

los que se analiza tanto el biofilm como el crecimiento vuelven a confirmar que existen diferencias fenotípicas entre los aislados pediátricos y los de adultos para estos serotipos.

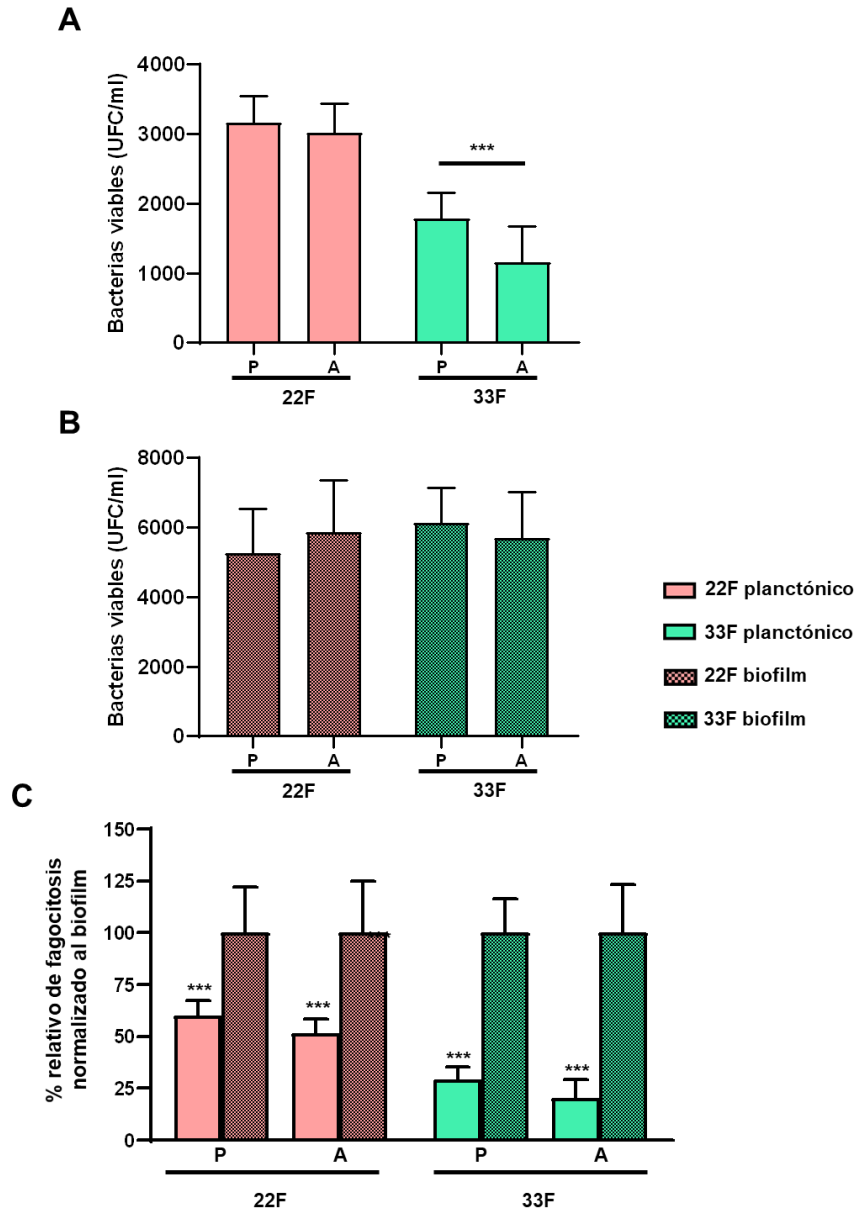


**Figura 18.** Curvas de crecimiento de los aislados clínicos 22F y 33F. **(A)** Curvas de crecimiento a 37 °C de los aislados clínicos y cepas control. **(B)** Curvas de crecimiento a 37 °C del aislado clínico 22F adulto con el control no capsulado M11. M11, cepa no-encapsulada; P244, transformante isogénico 22F; P017, transformante isogénico 33F; P, pediátrico; A, de adulto.



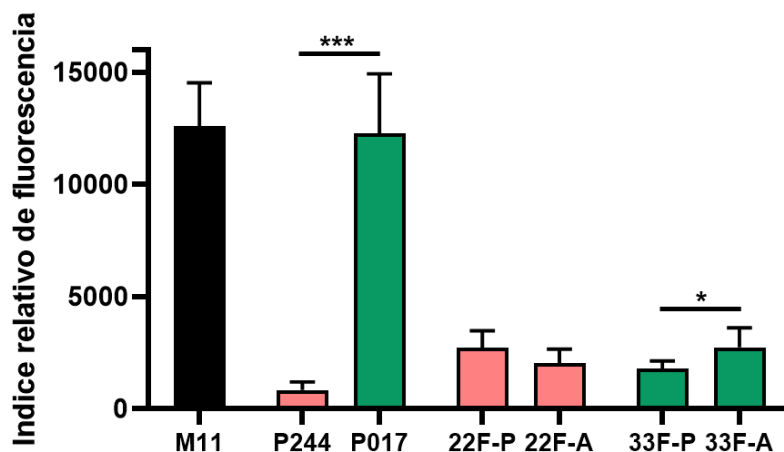
**Figura 19.** Curvas de crecimiento de los aislados clínicos 22F y 33F. **(A)** Curvas de crecimiento a 37 °C de la cepa no capsulada M11 y los transformantes isogénicos 22F (P244) y 33F (P017). **(B)** Curvas de crecimiento a 37 °C de los aislados clínicos 22F y 33F pediátricos y adultos. M11, cepa no-encapsulada; P244, transformante isogénico 22F; P017, transformante isogénico 33F; P, pediátrico; A, de adulto.

Posteriormente, se estudiaron los mecanismos de evasión del sistema inmune de los aislados clínicos 22F y 33F analizados. Primero se analizó el reconocimiento de los aislados clínicos por células fagocíticas HL-60 diferenciadas a neutrófilos (**Figura 20**). Como ya mencionamos previamente, la fagocitosis de *S. pneumoniae*, en presencia o no de anticuerpos específicos, es el mecanismo más eficaz para luchar frente a la infección neumocócica (Standish y Weiser, 2009). Aunque el factor de virulencia principal para evadir la fagocitosis es el CPS, el fondo genético también contribuye significativamente a esta evasión (Hyams *et al.*, 2011, McAllister *et al.*, 2011). Además, se decidió estudiar también la evasión del biofilm de estos aislados clínicos, ya que se ha observado previamente que el biofilm de *S. pneumoniae* evade mejor la fagocitosis que el cultivo planctónico (Domenech *et al.*, 2013). En la **Figura 20** se puede observar la evasión del sistema inmune por los aislados clínicos pediátricos y de adultos de los serotipos 22F y 33F. En el caso de los cultivos planctónicos no se observan diferencias entre los aislados mientras que, en el caso del serotipo 33F, se observa que el aislado pediátrico evade mejor la opsonofagocitosis que el de adulto (**Figura 20A**). Además, se aprecia que los aislados clínicos del serotipo 22F evaden mejor la opsonofagocitosis que los aislados clínicos de serotipo 33F cuando se encuentran en estado planctónico (**Figura 20A**). Estas diferencias dejan de apreciarse cuando se analiza la fagocitosis de los cuatro aislados en estado de biofilm, donde todos los biofilms evaden de una manera similar la fagocitosis y no se encuentran diferencias entre aislados pediátricos o de adultos ni entre los serotipos 22F y 33F (**Figura 20B**). Por último, al comparar la evasión de la opsonofagocitosis de los cultivos planctónicos frente a la de los biofilms, se pudo observar que los aislados clínicos en forma de biofilm evadieron mejor el sistema inmune que en estado planctónico (**Figura 20C**).



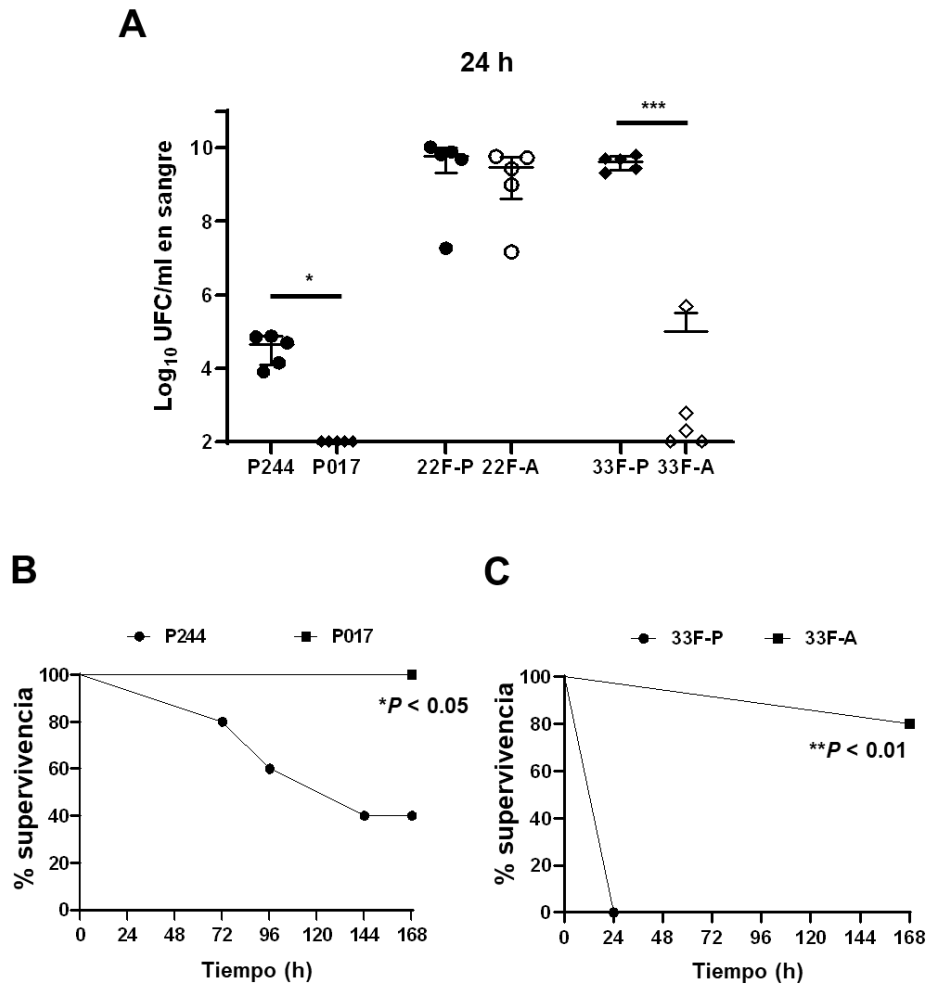
**Figura 20.** Evasión de la opsonofagocitosis de los aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F. **(A)** Supervivencia bacteriana de los aislados clínicos con origen pediátrico (P) o de adulto (A) crecidos como cultivos planctónicos. **(B)** Supervivencia bacteriana de los aislados clínicos con origen pediátrico o de adulto crecidos como biofilm. **(C)** Comparación de la fagocitosis de los aislados crecidos como cultivos planctónicos vs. crecidos como biofilm. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\* $P < 0.001$ ).

Para estudiar más a fondo la evasión del sistema inmune se analizó también el depósito del componente C3 del complemento en el cultivo planctónico de los diferentes aislados clínicos, junto a la cepa no capsulada M11 y los transformantes isogénicos 22F (P244) y 33F (P017) tomados como controles. Los resultados muestran de nuevo que el serotipo 22F evade mejor el sistema inmune que el serotipo 33F. En la **Figura 21** se puede observar que existen mayores niveles de C3 en la cepa no capsulada M11 seguido del transformante isogénico 33F (P017). Por el contrario se observan niveles mucho más bajos de C3 en el transformante isogénico 22F (P244), confirmando que la cápsula de tipo 22F evade mucho mejor la inmunidad del complemento que la cápsula de tipo 33F. Cuando se analizan los aislados clínicos, se observan resultados que confirman los hallazgos de fagocitosis demostrando que en el serotipo 33F, el aislado pediátrico evade mejor la inmunidad del complemento que el aislado de adulto (**Figuras 20A y 21**).



**Figura 21.** Depósito del componente C3 en aislados clínicos 22F y 33F. Los resultados están expresados como índice relativo de fluorescencia. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\* $P < 0.001$ ). M11, cepa no-encapsulada; P244, transformante isogénico 22F; P017, transformante isogénico 33F; P, pediátrico; A, adulto.

Por último, se decidió estudiar la virulencia de los aislados clínicos 22F y 33F en un modelo murino de sepsis neumocócica (**Figura 22**). Para ello, se inocularon intraperitonealmente los dos transformantes isogénicos y los cuatro aislados clínicos de serotipos 22F y 33F en diferentes grupos de ratones, y se midieron las UFC/ml en sangre a las 24 h y la supervivencia a lo largo de una semana (**Figura 22**). Las infecciones utilizando los transformantes isogénicos de la cepa M11 expresando los CPS del serotipo 22F (P244) y 33F(P017) confirmaron que el CPS del serotipo 22F confiere una capacidad invasiva mayor que el CPS del serotipo 33F, ya que aquí el fondo genético es el mismo (**Figura 22**). El transformante isogénico 22F tiene mayor capacidad de replicarse en sangre (**Figura 22A**) y es más letal (**Figura 22B**) que el serotipo 33F. Respecto a los aislados clínicos, se pudo observar que el serotipo 22F fue muy letal independientemente del origen del aislado, matando a todos los ratones en las primeras 30 h (datos no mostrados) y presentando altos niveles de UFC/ml en sangre (**Figura 22A**). En relación al serotipo 33F se vuelve a observar la diferencia entre el aislado pediátrico y el de adulto, ya que se obtiene un mayor número de UFC/ml en sangre en el aislado pediátrico (**Figura 22A**) y su letalidad fue notablemente superior (**Figura 22C**). Estos resultados concuerdan con la mayor resistencia a la fagocitosis y menor depósito del componente C3 del complemento del aislado 33F pediátrico respecto al aislado 33F de adulto (**Figuras 19A y 20**).



**Figura 22.** Virulencia de los aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F en un modelo murino de sepsis neumocócica. **(A)** Recuentos de colonias expresados como Log<sub>10</sub> UFC/ml de la sangre de ratones infectados con los transformantes isogénicos o aislados clínicos 22F y 33F a las 24 h de infección. **(B)** Curva de supervivencia del transformante isogénico 22F (P244) y 33F (P017). **(C)** Curva de supervivencia de los aislados clínicos 33F pediátrico y 33F adulto. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.05; \*\*\**P*<0.001 para los recuentos de viables y test Log-Ran: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01 para las curvas de supervivencia). M11, cepa no-encapsulada; P244, transformante isogénico 22F; P017, transformante isogénico 33F; P, pediátrico; A, de adulto.

### 1.5. Interacción del sistema inmune frente a nuevos serotipos vacunales

En el último objetivo del primer capítulo de la presente Memoria nos propusimos explorar la interacción de diferentes serotipos con el sistema inmune. Lo primero que se estudió fue cómo diferentes serotipos vacunales y no vacunales evaden la opsonofagocitosis por neutrófilos humanos (**Figura 23**), ya que esto podría explicar las diferencias en su carga de enfermedad a nivel epidemiológico. Para que el único factor diferencial fuese el CPS, se utilizaron transformantes isogénicos que proceden de la cepa no capsulada M11 (**Tabla 2, Figura 23**). Se escogieron los serotipos vacunales 3 y 19A de la VCN13 porque aún siguen siendo muy prevalentes en la epidemiología actual (Ladhani *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020, Ouldali *et al.*, 2021, Mokaddas *et al.*, 2021) y los serotipos 22F y 33F por estar incluidos en las nuevas vacunas VCN15 y VCN20. Los serotipos 8 y 11A se escogieron por su gran carga de enfermedad en la ENI y su asociación con la resistencia a los antibióticos, respectivamente (Aguinagalde *et al.*, 2015, de Miguel *et al.*, 2020), además de estar incluidos en la vacuna VCN20. Por último, como serotipo no incluido en ninguna de las nuevas vacunas conjugadas pero muy relevante en la ENI y en la resistencia a los antibióticos, se escogió el serotipo 24F (de Miguel *et al.*, 2020, Ouldali *et al.*, 2021).

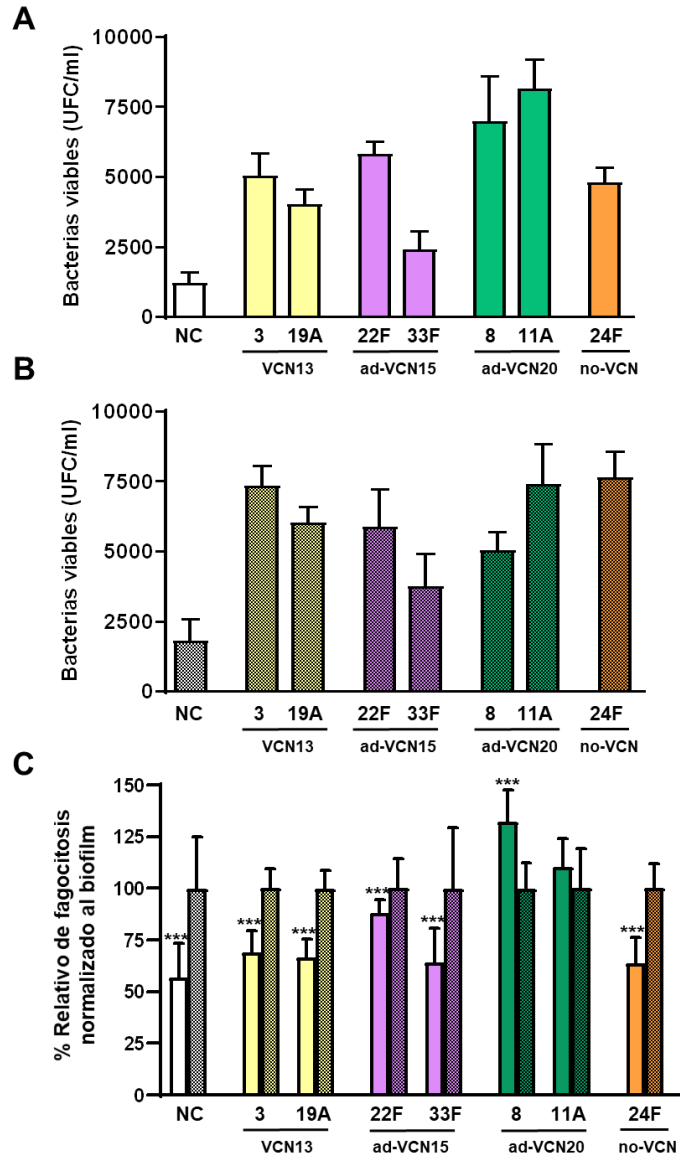
El uso de la cepa M11 para construir mutantes isogénicos en los que la única diferencia es el CPS es una buena estrategia para evaluar variaciones en la fagocitosis mediadas por el CPS y no por el fondo genético de las cepas. Como se realizó previamente con los aislados clínicos 22F y 33F, se estudió la opsonofagocitosis de la bacteria creciendo como cultivo planctónico o en estado de biofilm (**Figura 23**).

En cultivos planctónicos, el análisis de los dos serotipos VCN13 confirmó que la cepa con el CPS del serotipo 3 fue más resistente a la fagocitosis que la cepa del serotipo 19A ( $***P < 0.001$ , *t* de Student de dos colas) (**Figura 23A**). Los dos serotipos adicionales de la VCN15 (22F y 33F) mostraron niveles de opsonofagocitosis diferentes, siendo la cápsula del serotipo 22F más resistente que la del serotipo 33F, lo que confirma estudios previos en esta Tesis a nivel de interacción con el sistema inmune ( $***P < 0.001$ , *t* de Student de dos colas) (**Figura 23A**). Estos hallazgos, en su conjunto, podrían explicar por qué el serotipo 22F causa más casos de ENI y tanto en

niños como en adultos, que el serotipo 33F (**Figuras 11 y 12**). Las cepas de los serotipos 8 y 11A incluidos en la VCN20 mostraron la mayor resistencia a la opsonofagocitosis ( $***P<$ , ANOVA unidireccional en ambos casos), mientras que el serotipo no-VCN 24F fue fagocitado a los mismos niveles que los serotipos 3 y 19A incluidos en la VCN13 (**Figura 23A**). El control no capsulado M11 fue la cepa que peor evadió la fagocitosis, resultado esperable por su carencia de CPS.

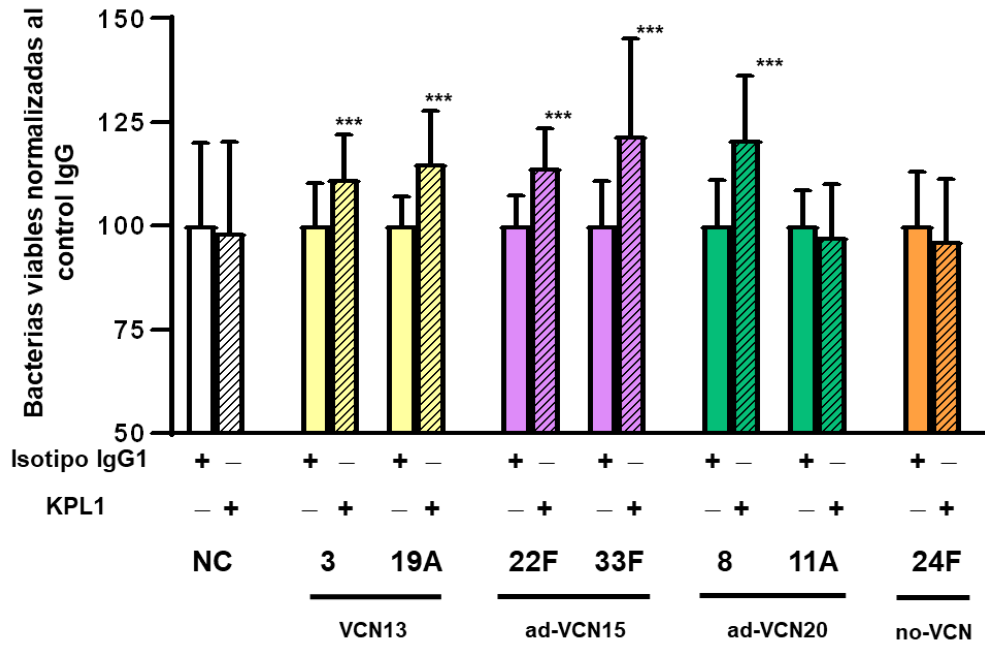
El análisis de evasión de la fagocitosis utilizando estas mismas cepas, pero en estado de biofilm, mostraron que la cepa expresando el CPS del serotipo 3 sigue siendo más resistente a la fagocitosis que la cepa expresando el CPS del serotipo 19A ( $***P<0.001$ , *t* de Student de dos colas) (**Figura 23B**). Respecto a los serotipos 22F y 33F incluidos en la VCN15, el transformante isogénico del serotipo 22F evadió mejor la fagocitosis que el 33F ( $***P<0.001$ , *t* de Student de dos colas) (**Figura 23B**). Estos resultados contrastan con lo observado anteriormente usando cepas clínicas donde no había diferencias en la fagocitosis (**Figura 20B**). En cuanto a los serotipos 8 y 11A, los transformantes isogénicos expresando estas cápsulas y crecidos en forma de biofilm se aprecia una mayor evasión de la fagocitosis del serotipo 11A respecto al serotipo 8 ( $***P<0.001$ , *t* de Student de dos colas) (**Figura 23B**) que contrasta con los resultados de estas mismas cepas, pero crecidas en forma planctónica donde no se observaban diferencias. El biofilm del serotipo 24F fue de los más resistentes a la fagocitosis, con niveles similares a los obtenidos con los biofilms de los serotipos 3 y 11A (**Figura 23B**).

Al comparar la resistencia a la opsonofagocitosis de cultivos planctónicos y biofilm se observó que, en casi todos los casos, el biofilm supone una ventaja a la hora de evadirla (**Figura 23C**), a excepción de los serotipo 8 y 11A, donde se puede ver que en el serotipo 8 el cultivo planctónico evadía mejor la fagocitosis ( $***P<0.001$ , *t* de Student de dos colas) y en el serotipo 11A donde no hubo diferencias significativas entre cultivo planctónico y biofilm (**Figura 23C**).



**Figura 23.** Influencia del CPS en la evasión de la opsonofagocitosis. **(A)** Supervivencia bacteriana de los transformantes isogénicos crecidos como cultivos planctónicos. **(B)** Supervivencia bacteriana de los transformantes isogénicos crecidos como biofilm. **(C)** Comparación de la fagocitosis de transformantes isogénicos crecidos como cultivos planctónicos vs. crecidos como biofilm. Las barras de error representan desviación estándar y los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\* $P < 0.001$ ). NC, cepa no capsulada M11.

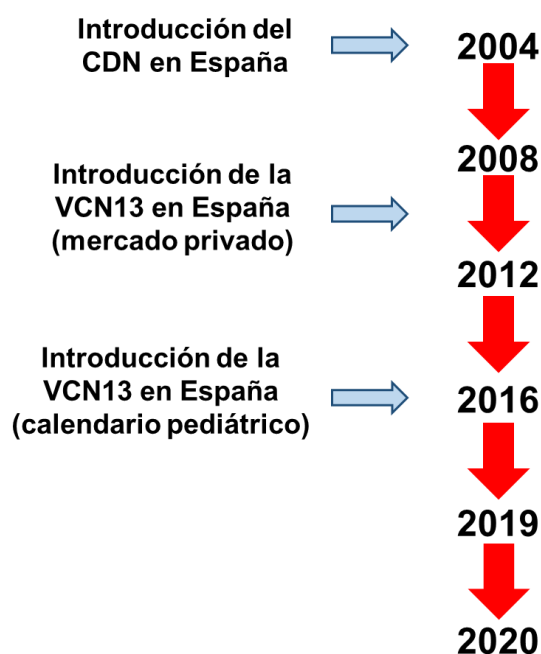
Por último, se evaluó el papel del receptor PSGL-1 en la fagocitosis de estos mismos serotipos incluidos o no en las vacunas conjugadas. Como ya se indicó en la introducción de esta Tesis Doctoral, el receptor PSGL-1 reconoce específicamente el CPS y la LytA de *S. pneumoniae* y la evasión del mismo podría ser un aspecto importante que explique el aumento de casos por determinados serotipos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). La fagocitosis mediada por el receptor PSGL-1 se realizó en ausencia de suero para evitar cualquier interferencia con los receptores del complemento. En ausencia de cápsula, que utilizamos como control (cepa no capsulada M11), no se observó diferencias en la fagocitosis independientemente del bloqueo o no del receptor PSGL-1 (**Figura 24**). Esto confirma que la presencia de cápsula es necesaria para la fagocitosis mediada por PSGL-1. Para los serotipos 3 y 19A, el bloqueo de PSGL-1 con el anticuerpo KPL1 incremento su viabilidad, confirmando que este receptor reconoce el CPS de los serotipos 3 y 19A y está implicado en su fagocitosis (**Figura 24**). Los mismos resultados se obtuvieron con los serotipos adicionales 22F y 33F de la VCN15 y por el serotipo 8 incluido en la VCN20, ya que la inhibición del receptor PSGL-1 aumentó la resistencia a la fagocitosis, demostrando que este receptor es importante también para la fagocitosis de los serotipos 22F, 33F y 8 (**Figura 24**). Sin embargo, la fagocitosis de los serotipos 11A y 24F fue similar en presencia o ausencia de PSGL-1, sugiriendo que el CPS de estos dos serotipos no es reconocido por este receptor lo que podría explicar la emergencia de ambos serotipos en la ENI en los últimos años y que estén asociados a elevadas tasas de mortalidad (**Figura 24**).



**Figura 24.** Fagocitosis de diferentes serotipos mediada por el receptor PSGL-1. Los resultados expresan las bacterias viables después de la fagocitosis de los diferentes transformantes isogénicos. Las células fagocíticas se incubaron con un control negativo de isotipo IgG que no bloquea PSGL-1 (barras de colores sin patrón) o se incubaron con el anticuerpo KPL1 que bloquea PSGL-1 (barras de colores rayadas). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\* $P < 0.001$ ). NC, cepa no capsulada M11.

## 2. EVOLUCIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CEFDITOREN Y OTROS ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EN ESPAÑA DURANTE EL PERIODO 2004-2020

Como se comentó previamente, una de las principales preocupaciones respecto a la infección neumocócica es el aumento de serotipos no vacunales que causen ENI, algunos de estos relacionados con la resistencia a los antibióticos. Por ello, la vigilancia de los patrones de resistencia a antibióticos de *S. pneumoniae* resulta necesaria para evaluar el impacto de las medidas profilácticas en la prevalencia de cepas resistentes de este patógeno. Para abarcar esto se diseñó un estudio para evaluar la evolución de la susceptibilidad a antibióticos en aislados clínicos de *S. pneumoniae* no susceptibles a penicilina (PEN) en España durante el periodo 2004-2020 (**Figura 25**). Los antibióticos evaluados fueron PEN, amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), eritromicina (ERY), levofloxacino (LVX) y tres cefalosporinas orales incluyendo cefditoren (CDN), cefixima (CFX) y cefpodoxima (CFD).

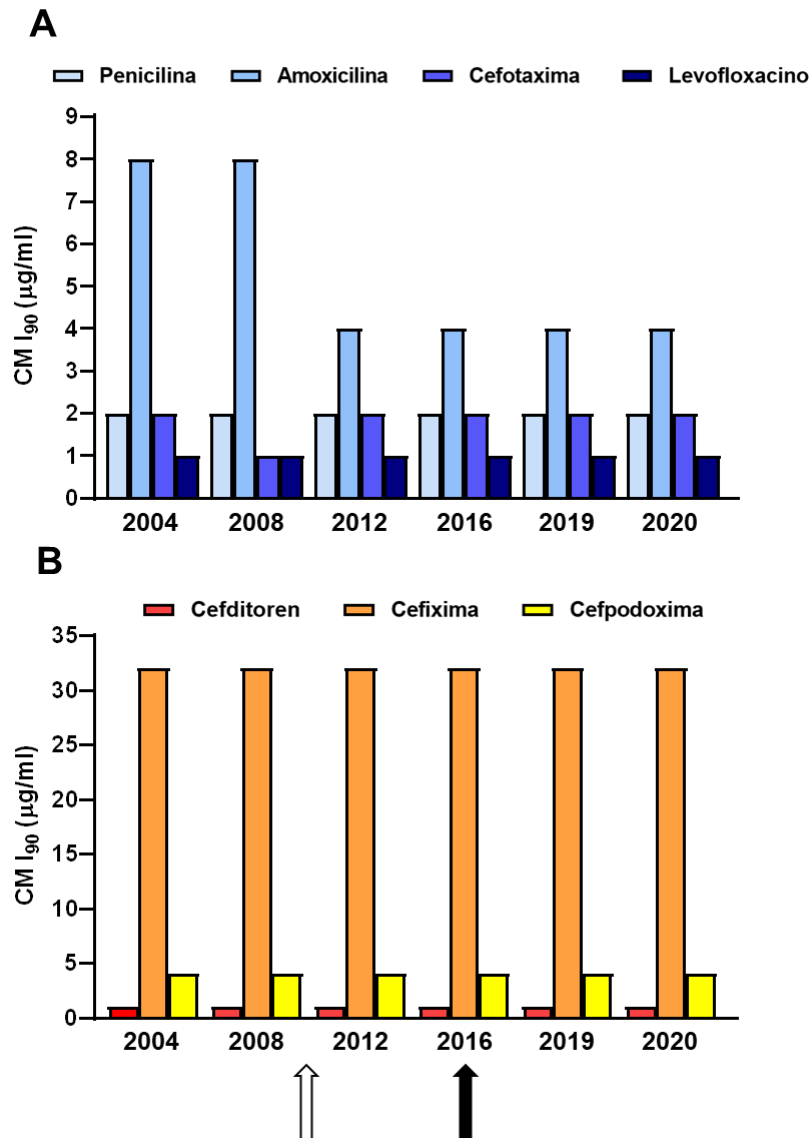


**Figura 25.** Esquema de la selección de aislados clínicos de *S. pneumoniae* no susceptibles a PEN.

Este estudio incluye 3017 aislados clínicos de *S. pneumoniae* no susceptibles a PEN recibidos en el LRN. El estudio comienza con aislados clínicos recibidos en el año 2004 coincidiendo con la introducción en España de uno de los antibióticos de interés, la cefalosporina oral de tercera generación cefditoren. A partir de este año se incluyeron aislados clínicos cada 4 años (2008, 2012 y 2016) y los dos últimos años recientes de los que se disponía de datos epidemiológicos completos (2019 y 2020) (**Figura 25**). Se tuvo en cuenta el año en el que la VCN13 fue comercializada en el mercado privado (2010) e incluida en el calendario pediátrico (2016) para evaluar la evolución de serotipos vacunables y resistencia a antibióticos antes y después de introducir la VCN13 en el mercado. De cada año mostrado en la **Figura 25** se incluyeron al menos 500 aislados no susceptibles a PEN escogidos de manera aleatoria por la herramienta de selección *random* de Microsoft Excel. Para su posterior análisis, se agruparon las cepas en tres categorías dependiendo del lugar de infección (neumonías invasivas, neumonías no invasivas y no respiratorias invasivas).

Durante el estudio se observó un patrón constante de baja susceptibilidad a penicilina, cefotaxima y levofloxacino con valores similares de la CMI<sub>90</sub> de 2 µg/ml (para PEN y CTX) y 1 µg/ml (para LVX) durante los 16 años investigados (**Figura 26A**). Sin embargo, para amoxicilina, nos encontramos con una reducción de la CMI<sub>90</sub> de 8 µg/ml durante el periodo pre-VCN13 (los años 2004 y 2008) a 4 µg/ml después de la introducción de la VCN13 en 2010 (**Figura 26A**). La CMI<sub>90</sub> de la eritromicina se mantuvo en 128 µg/ml a lo largo del periodo de estudio (**Tabla 10**). Este patrón constante de baja susceptibilidad también se observó en los valores de la CMI<sub>50</sub> de la penicilina, cefotaxima y levofloxacino (**Tabla 10**) y, en el caso de la CMI<sub>50</sub>, la reducción de este valor para la amoxicilina a partir de la introducción de la VCN13 no se ve tan clara.

Respecto a las cefalosporinas orales, la cefixima fue la que mayores valores de CMI<sub>90</sub> y CMI<sub>50</sub> tuvo a lo largo del periodo de estudio, con valores de 32 µg/ml y 16/8 µg/ml respectivamente (**Figura 26B y Tabla 10**). La cefpodoxima fue la segunda cefalosporina con mayores valores de CMI<sub>90</sub> y CMI<sub>50</sub> durante el periodo estudiado siendo estos de 4 µg/ml y 2 µg/ml respectivamente (**Figura 26B y Tabla 10**).



**Figura 26.** CMI<sub>90</sub> de los diferentes antibióticos estudiados frente a 3017 aislados clínicos de *S. pneumoniae*. (A) CMI<sub>90</sub> de los diferentes agentes antimicrobianos usados comúnmente frente a *S. pneumoniae*. (B) CMI<sub>90</sub> de tres cefalosporinas orales incluido el cefditoren (CDN). CMI<sub>90</sub>, concentración mínima inhibitoria en la que al menos el 90% de los aislados son inhibidos (µg/ml). Las barras blanca y negra indican la introducción de la VCN13 en el mercado privado (2010) y en el calendario pediátrico nacional (2016), respectivamente.

Por otro lado, para el cefditoren, la CMI<sub>90</sub> y CMI<sub>50</sub> fueron de 1 µg/ml y 0.5/0.25 µg/ml respectivamente (**Figura 26B** y **Tabla 10**), mostrando los valores más bajos dentro del grupo de cefalosporinas orales de tercera generación estudiadas.

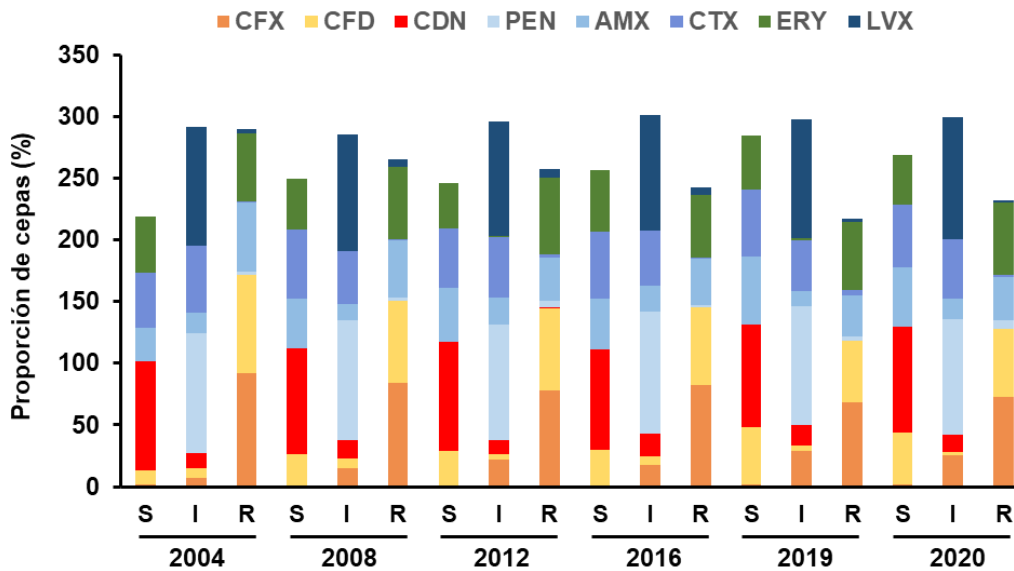
Estos resultados indican que tanto la cefotaxima como el cefditoren fueron los antibióticos β-lactámicos con mayor actividad. Al comparar los valores de la CMI del cefditoren frente a los diferentes antibióticos β-lactámicos se obtienen diferencias estadísticamente significativas con las CMIs más bajas (\*\**P* < 0.001, *t* de Student de dos colas), incluyendo a la cefotaxima. Además, al realizar una comparación múltiple mediante un análisis de varianza (ANOVA) frente a las cefalosporinas orales como cefixima y cefpodoxima, también se obtienen diferencias estadísticamente significativas con las CMIs más bajas (\*\**P* < 0.01, ANOVA unidireccional seguido de un test *post hoc* Dunnet).

**Tabla 10.** Actividad *in vitro* de diferentes antibióticos frente a aislados clínicos de *S. pneumoniae* durante el periodo 2004-2020.

CMI<sub>50/90</sub> = concentración mínima inhibitoria (µg/ml) en el que al menos el 50% o 90% de todos los aislados son inhibidos.

| Antibiótico   | 2004              |                   | 2008              |                   | 2012              |                   | 2016              |                   | 2019              |                   | 2020              |                   |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|               | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>90</sub> | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>90</sub> | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>90</sub> | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>90</sub> | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>90</sub> | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>90</sub> |
| Penicilina    | 1                 | 2                 | 1                 | 2                 | 1                 | 2                 | 1                 | 2                 | 1                 | 2                 | 1                 | 2                 |
| Amoxicilina   | 2                 | 8                 | 1                 | 8                 | 1                 | 4                 | 1                 | 4                 | 0.5               | 4                 | 1                 | 4                 |
| Cefotaxima    | 1                 | 2                 | 0.5               | 1                 | 1                 | 2                 | 0.5               | 2                 | 0.5               | 2                 | 0.5               | 2                 |
| Eritromicina  | 32                | 128               | 128               | 128               | 128               | 128               | 48                | 128               | 48                | 128               | 128               | 128               |
| Levofloxacino | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 | 1                 |
| Cefditoren    | 0.5               | 1                 | 0.5               | 1                 | 0.5               | 1                 | 0.5               | 1                 | 0.25              | 1                 | 0.25              | 1                 |
| Cefixima      | 16                | 32                | 16                | 32                | 16                | 32                | 16                | 32                | 8                 | 32                | 8                 | 32                |
| Cefpodoxima   | 2                 | 4                 | 2                 | 4                 | 2                 | 4                 | 2                 | 4                 | 0.5               | 4                 | 1                 | 4                 |

Además, se evaluó la proporción de aislados clínicos basándonos en su susceptibilidad, por los que se agruparon como susceptibles (S), susceptibles con exposición incrementada (I) y resistentes (R) siguiendo el criterio de EUCAST. De todos los antibióticos del estudio, de nuevo el cefditoren fue el antibiótico con el mayor porcentaje de aislados clínicos susceptibles durante el periodo de 16 años (**Figura 27 y Tabla 11**). Los antibióticos con la menor proporción de cepas resistentes durante el periodo estudio fueron cefditoren (< 0.4%), seguido de cefotaxima (< 5%), penicilina (< 6.5%) y levofloxacino (< 7%) (**Figura 27 y Tabla 11**). Al contrario, los antibióticos con mayor número de cepas resistentes fueron cefixima (> 68,4%), seguida de eritromicina (> 50,4%), cefpodoxima (> 49,8%) y amoxicilina (> 33,4%) (**Figura 27 y Tabla 11**).

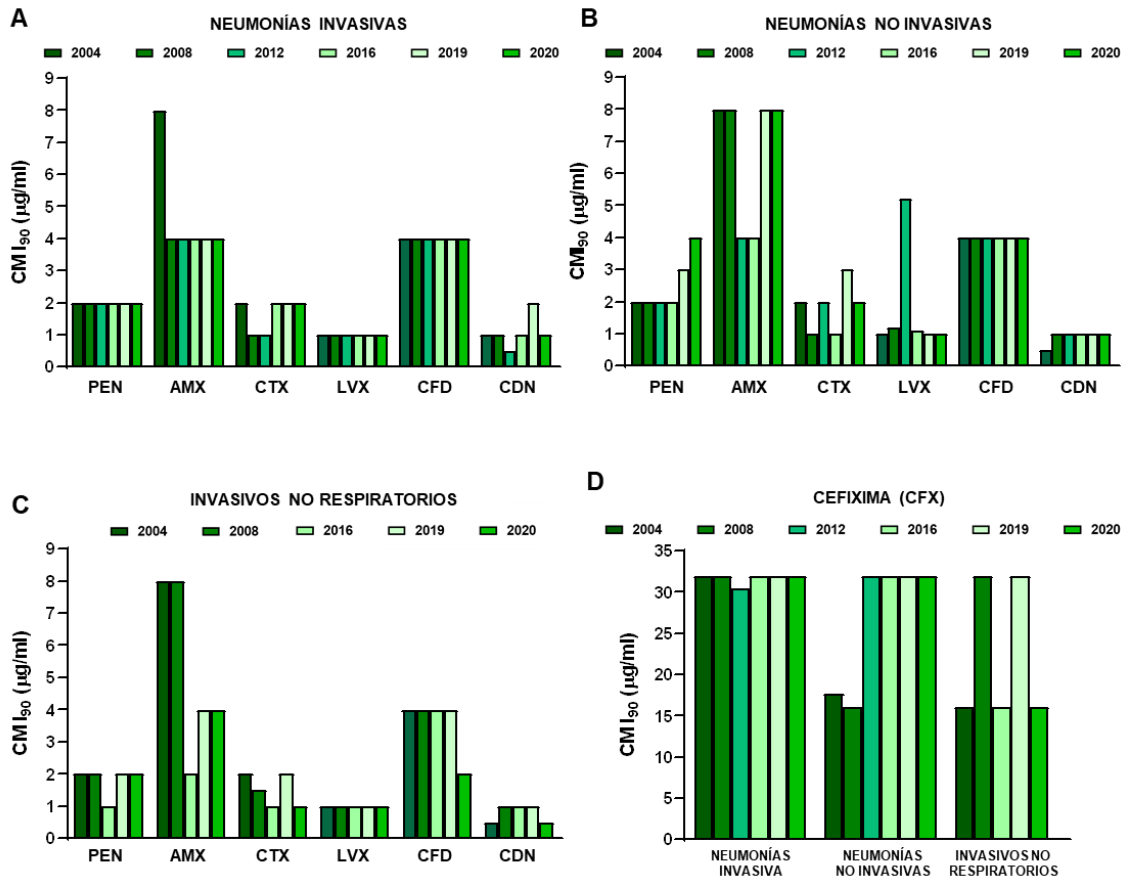


**Figura 27.** Distribución de la susceptibilidad de aislados clínicos de *S. pneumoniae* (no susceptibles a PEN) a diferentes antibióticos usando el criterio de EUCAST. S, susceptible; I, susceptible con exposición incrementada; R, resistente; CFX, cefixima; CFD, cefpodoxima; CDN, cefditoren; PEN, penicilina; AMX, amoxicilina; CTX, cefotaxima; ERY, eritromicina; LVX, levofloxacino.

**Tabla 11.** Distribución de la susceptibilidad de aislados clínicos de *S. pneumoniae* (no susceptibles a PEN) a diferentes antibióticos usando el criterio de EUCAST.

| Antibiótico    | 2004  |       |       | 2008  |       |       | 2012  |       |       | 2016  |       |       | 2019  |       |       | 2020  |       |       |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                | S (%) | I (%) | R (%) | S (%) | I (%) | R (%) | S (%) | I (%) | R (%) | S (%) | I (%) | R (%) | S (%) | I (%) | R (%) | S (%) | I (%) | R (%) |
| Penicilina     | 0     | 97.6  | 2.4   | 0     | 97.4  | 2.6   | 0     | 94.2  | 5.8   | 0     | 98.8  | 1.2   | 0     | 96.2  | 3.8   | 0     | 93.6  | 6.4   |
| Amoxicilina    | 27.2  | 16.4  | 56.5  | 40.16 | 13.7  | 46.2  | 43.6  | 21.4  | 35    | 41.2  | 21    | 37.8  | 54.6  | 12    | 33.4  | 47.5  | 16.8  | 35.7  |
| Cefotaxima     | 45.3  | 54.1  | 0.6   | 56.8  | 42.6  | 0.6   | 48.4  | 49.4  | 2.2   | 54.6  | 44.4  | 1     | 54.2  | 41.6  | 4.2   | 51.2  | 47.9  | 1     |
| Eritromcina    | 44.9  | 0     | 55.1  | 40.7  | 0     | 59.2  | 36.8  | 0.4   | 62.8  | 49.4  | 0.2   | 50.4  | 43.8  | 1.6   | 54.6  | 40.5  | 0.8   | 58.7  |
| Levoflox-acino | 0     | 96.6  | 3.4   | 0     | 94.4  | 5.6   | 0     | 93.2  | 6.8   | 0     | 94    | 6     | 0     | 96.6  | 3.4   | 0     | 98.3  | 1.7   |
| Cefpodoxima    | 11.6  | 8.4   | 80    | 25.7  | 8.2   | 66.1  | 28.8  | 4.4   | 66.8  | 29.2  | 7.2   | 63.6  | 46    | 4.2   | 49.8  | 41.9  | 2.5   | 55.6  |
| Cefditoren     | 88.2  | 11.8  | 0     | 85.54 | 14.3  | 0.2   | 88    | 11.6  | 0.4   | 81.4  | 18.4  | 0.2   | 83.6  | 16.4  | 0     | 86.3  | 13.5  | 0.2   |
| Cefixima       | 1.4   | 6.8   | 91.8  | 0.6   | 14.9  | 84.5  | 0.6   | 21.6  | 77.8  | 0.6   | 17.4  | 82    | 2.2   | 29.4  | 68.4  | 1.7   | 25.9  | 72.4  |
| Cefpodoxima    | 11.6  | 8.4   | 80    | 25.7  | 8.2   | 66.1  | 28.8  | 4.4   | 66.8  | 29.2  | 7.2   | 63.6  | 46    | 4.2   | 49.8  | 41.9  | 2.5   | 55.6  |

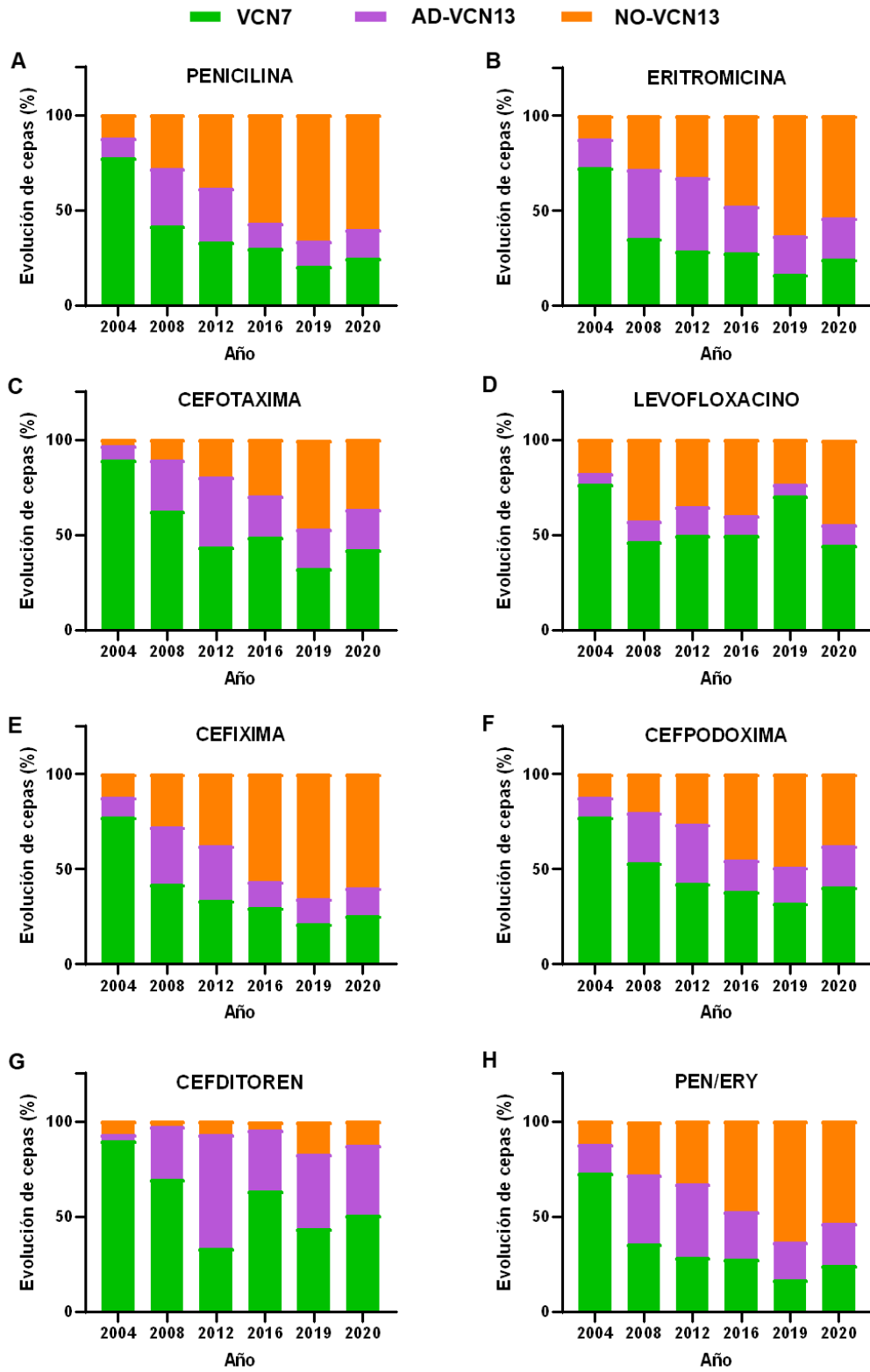
Se analizó la relación entre el origen del aislado y su patrón de susceptibilidad, para los antibióticos anteriormente mencionados, incluyendo aislados procedentes de neumonías invasivas, neumonías no invasivas y aislados invasivos no-respiratorios. Si nos fijamos en la **Figura 28**, que representa los valores de CMI<sub>90</sub> a lo largo de todo el periodo del estudio, podemos observar que la CMI<sub>90</sub> se mantiene para la mayoría de los antibióticos, independientemente de su lugar de origen. La amoxicilina disminuyó de 8 µg/ml a 4 µg/ml durante el periodo de 2012-2016 para todos los orígenes (**Figura 28A-C**), incrementando a 8 µg/ml en los aislados clínicos que corresponden a neumonías no invasivas, pero manteniéndose en el resto de grupos. Respecto a las neumonías no invasivas, podemos observar un aumento progresivo de la CMI<sub>90</sub> de la penicilina (**Figura 28B**). Dentro de los β-lactámicos, la cefixima fue el antibiótico que mayor valor de CMI<sub>90</sub> tiene tanto en aislados clínicos invasivos como no invasivos, seguido de la amoxicilina y la cefpodoxima (**Figura 28**). Por el contrario, cefditoren seguido de cefotaxima fueron los que mostraron valores de CMI<sub>90</sub> menores en todo el periodo estudiado y esta actividad es independiente del origen clínico de las cepas.



**Figura 28.** Actividad *in vitro* de los diferentes antibióticos usados frente a *S. pneumoniae* según el origen de los aislados clínicos. (A) CMI<sub>90</sub> de los antibióticos frente a aislados clínicos de neumonías invasivas. (B) CMI<sub>90</sub> de los antibióticos frente a aislados clínicos de neumonías no invasivas. (C) CMI<sub>90</sub> de los antibióticos frente a aislados clínicos invasivos no respiratorios. (D) CMI<sub>90</sub> de la cefixima frente a aislados de neumonías invasivas, neumonías no invasivas e invasivas no respiratorias. CMI<sub>90</sub>, concentración mínima inhibitoria en la que al menos el 90% de los aislados son inhibidos (µg/ml).

Por último, se analizó el impacto de la vacunación neumocócica en la evolución de las resistencias para los diferentes antibióticos usados a lo largo del estudio e incluyendo cepas categorizadas como I y R (**Figura 29**). La proporción de serotipos incluidos en la VCN7 mostró una reducción constante para todos los antibióticos, demostrando que las vacunas conjugadas neumocócicas son efectivas para controlar la enfermedad neumocócica asociada a cepas con susceptibilidad antibiótica disminuida (**Figura 29**). Otro aspecto que se observa es el aumento de la resistencia desde el año 2004 en cepas de serotipos cubiertos por la VCN13 pero no por la VCN7 hasta 2012, año a partir del cual se observó una disminución del porcentaje de cepas resistentes, demostrando la eficacia de la VCN13 después de su introducción en la población pediátrica española en 2010 (**Figura 29**). Por otro lado, se observa un aumento desde 2004 de cepas I/R que pertenecen a serotipos no vacunales para todos los antibióticos excepto para el cefditoren, que se mantuvo en proporciones muy bajas durante todo el periodo de estudio (**Figura 29G**). La penicilina, la eritromicina y la cefixima fueron los antibióticos con mayor proporción de cepas no susceptibles pertenecientes a serotipos no vacunales.

Respecto a cepas asociadas a susceptibilidad reducida (I/R) a penicilina y eritromicina, se observa que disminuyeron tanto los aislados que pertenecían a serotipos incluidos en la VCN7 como a la VCN13, mientras que serotipos no-VCN13 sufrieron un crecimiento constante a lo largo de los 16 años de estudio (**Figura 29H**). Esta situación es preocupante, ya que más del 50% de los aislados con susceptibilidad reducida a PEN y ERY no están incluidos en las vacunas conjugadas actuales.



**Figura 29.** Evolución de los patrones de resistencia a distintos antibióticos durante el periodo 2004-2020. Los aislados clínicos susceptibles con exposición incrementada (I) y resistentes (R) fueron analizados en función del serotipo agrupándolos en tres categorías: serotipos incluidos en la VCN7 (VCN7, barras verdes), serotipos adicionales incluidos en la VCN13 pero no en la VCN7 (AD-VCN13, barras moradas) y serotipos no incluidos en la VCN13 (NO-VCN13, barras naranjas). (A) Aislados I/R frente a penicilina. (B) Aislados I/R frente a eritromicina. (C) Aislados I/R frente a cefotaxima. (D) Aislados I/R frente a levofloxacino. (E) Aislados I/R frente a cefpodoxima. (G) Aislados I/R frente al cefditoren. (H) Aislados multirresistentes a penicilina y eritromicina. PEN, penicilina; ERY, eritromicina.

### 3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DE *S. AUREUS* SENSIBLE/RESISTENTE A METICILINA

#### 3.1. *S. aureus* en España

Como se resaltó en la introducción de esta Memoria, a pesar de que el género *Staphylococcus* incluye 52 especies y 28 subespecies, *S. aureus* es la especie que posee mayor relevancia clínica (Lee *et al.*, 2018). Este se encuentra habitualmente en la microbiota de la nasofaringe y piel de las personas, pero se puede romper el equilibrio e invadir otras localizaciones produciendo enfermedades mediadas por toxinas, piógenas o, incluso, llegar al torrente sanguíneo causando bacteriemia y muerte (Peacock y Paterson, 2015). La vigilancia de este patógeno es necesaria porque produce graves infecciones en pacientes hospitalizados y también de manera comunitaria, en niños y adultos previamente sanos. Además, la gran capacidad de *S. aureus* de adaptarse al huésped y adquirir nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos, obligan a realizar una vigilancia continuada de la resistencia.

Por ello el Laboratorio de Referencia de Infecciones Intrahospitalarias (LIH) recibe aislados clínicos de estafilococos procedentes de pacientes con sospecha clínica con el fin de caracterizarlos mediante técnicas moleculares —tanto de brotes como casos individuales— y realizar un control constante de las cepas multirresistentes, sobre todo aquellas con susceptibilidad disminuida a la meticilina. La especie se confirma mediante el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S. Además, se estudia si son productoras o no de toxinas como la PVL, TSST y las toxinas exfoliativas ETA y ETB. Para estudiar la resistencia a los antibióticos se analizan los genes *mecA* y *mecC*. En la **Tabla 12** se puede observar la proporción de aislados recibidos en el LIH en los tres últimos años con datos epidemiológicos completos. Hubo un aumento de aislados clínicos recibidos en 2019, pero en el año 2020, el año de la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2, el número de aislados recibido disminuyó (**Tabla 12**). En los tres periodos mostrados en la tabla se puede observar que la proporción de aislados con origen intrahospitalario y con origen comunitario se mantiene, siendo de un 60-62% y 37-40% respectivamente. Dentro de los aislados de origen intrahospitalario, la proporción de aislados SASM y SARM recibidos es equitativa, aunque en 2018 y 2020 se recibieron más aislados SASM (55-58%) que SARM (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Aislados clínicos de *S. aureus* recibidos.

| <b>Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias (CNM)</b> |                           |              |              |
|--|---------------------------|--------------|--------------|
| <b>Nº de aislados (%)</b>                                  |                           |              |              |
| <b>Origen</b>  | <b>2018</b>               | <b>2019</b>  | <b>2020</b>  |
| <b>Total</b>   | 722 (100%)                | 886 (100%)   | 616 (100%)   |
| <b>Intrahospitalario</b>                                   | 452 (62,60%)              | 524 (59,14%) | 379 (61,53%) |
| <b>Comunitario</b>   | 270 (37,40%)              | 363 (40,86%) | 237 (38,47%) |
| <b>Aislados intrahospitalarios</b>                         |                           |              |              |
| <b>Resistencia</b>   | <b>Nº de aislados (%)</b> |              |              |
| <b>Total</b>   | 452 (100%)                | 524 (100%)   | 379 (100%)   |
| <b>SASM</b>  | 251 (55,53%)              | 263 (50,20%) | 220 (58,04%) |
| <b>SARM</b>  | 201 (44,47%)              | 261 (49,80%) | 159 (41,96%) |

Además, en la **Tabla 13**, se muestran los datos de la Red Nacional de Vigilancia de la Salud Pública (RENAVE) del Centro Nacional de Epidemiología incluyendo los datos disponibles hasta la fecha (años 2018 y 2019). En este caso, se observa un mayor número de aislados totales notificados, pero la proporción de aislados intrahospitalarios y comunitarios es la inversa respecto a las cepas recibidas en el CNM (**Tablas 12 y 13**). En los dos años mostrados, el número de aislados es similar y hay un mayor porcentaje de aislados con origen comunitario (56-57%) que de origen intrahospitalario (42-43%). Asimismo, la proporción de aislados SASM o SARM dentro de los aislados intrahospitalarios es diferente a la obtenida en el CNM, siendo una gran mayoría de aislados SASM ( $\approx 65\%$ ) y, en menor proporción, SARM (28-30%). Además,

se pueden apreciar varios aislados notificados por los hospitales a la red RENAVE en los que no se identificó la resistencia a metilina.

**Tabla 13.** Cepas de *S. aureus* notificadas al RENAVE. Datos facilitados por Virginia Arroyo Nebreda y Pilar Gallego Berciano del CNE, ISCIII (RENAVE, 2021)

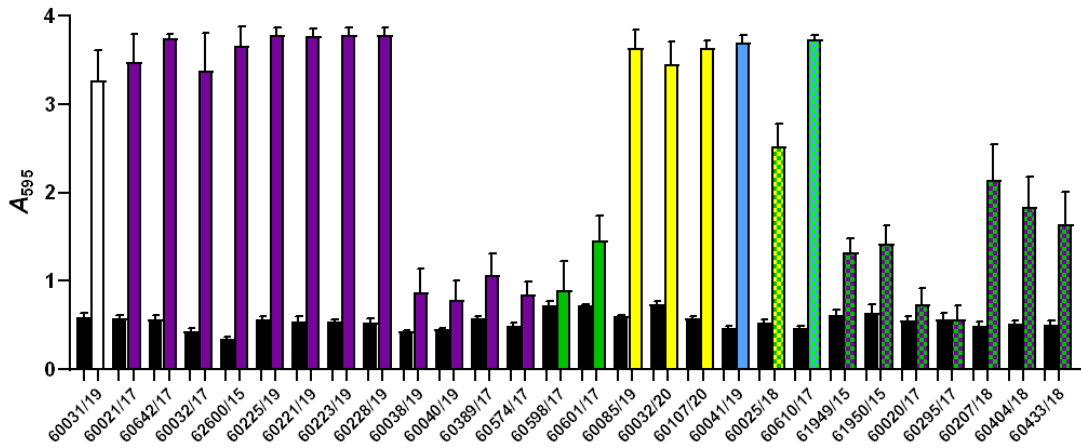
| RENAVE (Datos nacional)            |                    |              |
|------------------------------------|--------------------|--------------|
| Nº de aislados (%)                 |                    |              |
| Origen                             | 2018               | 2019         |
| <b>Total</b>                       | 990 (100%)         | 955 (100%)   |
| <b>Intrahospitalario</b>           | 435 (43,93%)       | 410 (42,93%) |
| <b>Comunitario</b>                 | 555 (56,07%)       | 545 (57,07%) |
| <b>Aislados intrahospitalarios</b> |                    |              |
| Resistencia                        | Nº de aislados (%) |              |
| <b>Total</b>                       | 435 (100%)         | 410 (100%)   |
| <b>SASM</b>                        | 280 (64,37%)       | 264 (64,39%) |
| <b>SARM</b>                        | 126 (28,97%)       | 123 (30,00%) |
| <b>Sin identificar</b>             | 29 (6,66%)         | 23 (5,61%)   |

### 3.2. Caracterización del biofilm de aislados clínicos SASM y SARM

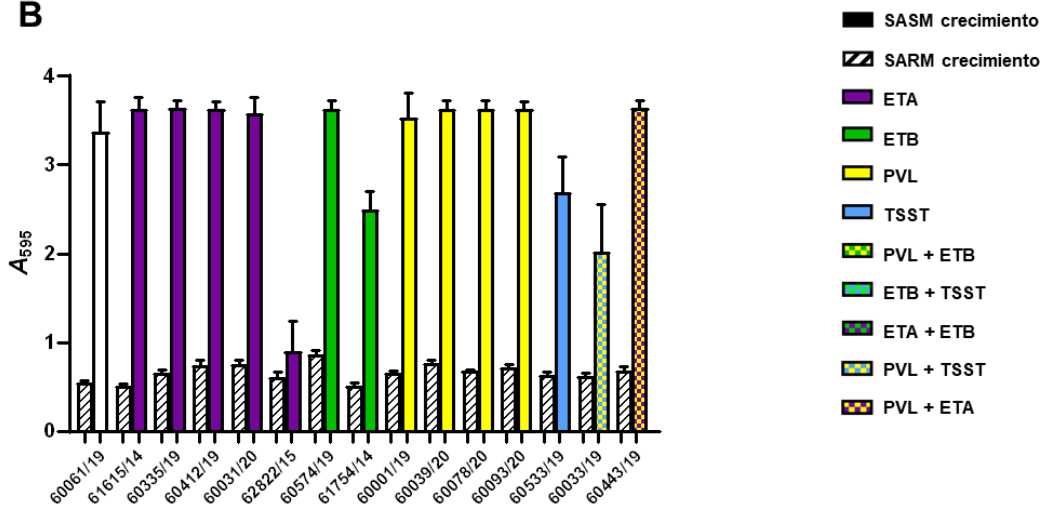
De la colección de aislados clínicos de *S. aureus* recibidos en el CNM, se seleccionaron al azar una serie de aislados SASM y SARM para caracterizarlos con más detalle. El primer estudio que se realizó con estos aislados fue la formación de biofilm. Previamente, se había descrito que los factores de virulencia podían tener un peso en la formación del biofilm de *S. aureus*, ya que su carga positiva podía interactuar con la superficie celular aniónica y el ADN formando puentes electrostáticos intercelulares, proporcionando de este modo estabilidad al biofilm maduro (Graf *et al.*,

2019). Entre estos factores de virulencia se pueden mencionar las hemolisinas, modulinas solubles en fenol, leucotoxinas, lipasas y las proteínas de adhesión extracelular (Graf *et al.*, 2019). Aprovechando que en el LIH del CNM se caracteriza la diferente producción de toxinas, se caracterizó el biofilm de diferentes cepas productoras de toxinas para observar si había una asociación en la formación de biofilm (**Figura 30**).

**A**



**B**



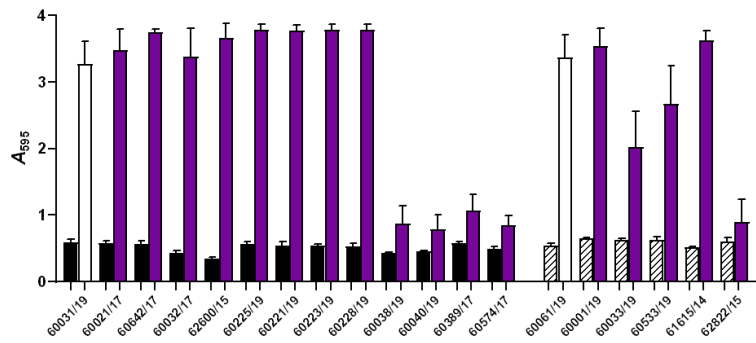
**Figura 30.** Formación de biofilm de aislados clínicos de *S. aureus* que expresan diversas toxinas. **(A)** Biofilm de los aislados clínicos SASM. Las barras negras indican el crecimiento total y las barras de diferentes colores indican el biofilm de los diferentes aislados clínicos productores de toxinas (leyenda). **(B)** Biofilm de los aislados clínicos SARM. Las barras blancas rayadas muestran el crecimiento total y las de diferentes colores indican el biofilm de los distintos aislados clínicos productores de toxinas (leyenda). Como controles se utilizaron aislados clínicos SASM y SARM no productores de toxinas (barras blancas).

Se analizó la capacidad de formación de biofilm de 28 aislados clínicos SASM (65%) y 15 aislados clínicos SARM (35%), representando la proporción de aislados notificados en RENAVE que se observa a nivel nacional (**Tabla 13**). En la **Figura 30** se muestra la formación de biofilm de los diferentes aislados clínicos. Existen aislados clínicos que producen sólo una toxina, pero también aislados con más de una. Se incluyeron dos controles, las cepas 60031/19 (SASM) y 60061/19 (SARM) que no producen ninguna toxina (**Figura 30**). No se observa ningún patrón claro en la capacidad de formación de biofilm con ninguna toxina, excepto que todos los aislados clínicos con la combinación ETA + ETB formaban poco ( $A_{595} \leq 1.5$ ) o intermedio biofilm ( $A_{595} > 2$  pero  $< 3$ ) y los que producían la TSST (sólo un aislado de cada tipo) o la PVL formaban todos muy buen biofilm ( $A_{595} \geq 3.5$ ). Además, no se observó una diferencia de cantidad de biofilm formado entre aislados SASM y aislados SARM que formaban buen o muy buen biofilm ( $A_{595} \geq 3-3.5$ ), pero había mayor proporción de aislados que formaban poco e intermedio biofilm en cepas SASM (12/28, 42,9%) que en cepas SARM (2/15, 13,3%), aunque el número de aislados caracterizados es diferente (**Figura 30 y Tabla 14**). Para estudiarlo más a fondo se decidió representar los diferentes factores de virulencia por separado respecto al control y eliminar aquellos aislados que tenían más de una toxina (**Figura 31**).

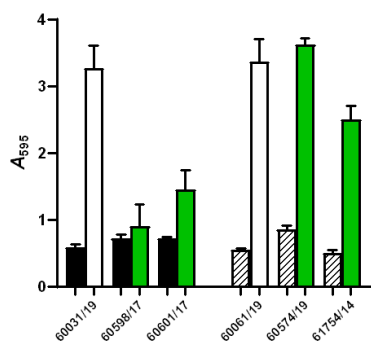
En la **Figura 31** se pueden observar los patrones de biofilm de los aislados clínicos con las cuatro principales toxinas analizadas. Respecto a ETA se apreció un patrón bimodal tanto en SASM como en SARM, con aislados que formaban muy buen biofilm ( $A_{595} \geq 3.5$ ) y aislados que formaban poco biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$ ) (**Figura 31**). Además, en ETB se pudo ver que existían diferencias entre aislados SASM (ambos aislados formaban poco biofilm) y aislados SARM (que formaban intermedio o buen biofilm), pero la muestra de aislados era muy pequeña (**Figura 31**). Todos los aislados con la toxina TSST y PVL formaban buen biofilm ( $A_{595} \geq 3$ ).

Además, se caracterizó el serotipo capsular de los aislados clínicos estudiados, ya que se ha relacionado diferente formación de biofilm según el serotipo capsular de *S. aureus* (Salimena *et al.*, 2016). En la **Tabla 14** se puede observar cada aislado clínico, su resistencia a meticilina, las toxinas que contienen, su formación de biofilm, su serotipo capsular, el grupo de edad del paciente, el tipo de infección y su procedencia

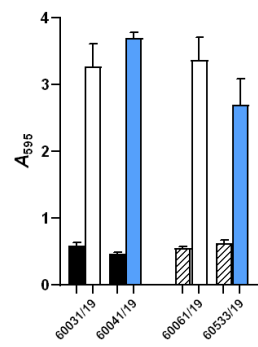
A



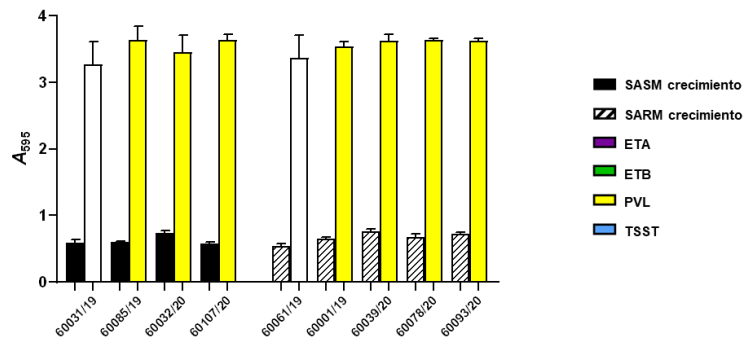
B



C



D



**Figura 31.** Formación de biofilm de aislados clínicos de *S. aureus* según el tipo de toxina. **(A)** Biofilm de los aislados clínicos SASM y SARM con ETA. **(B)** Biofilm de los aislados clínicos SASM y SARM con ETB. **(C)** Biofilm de los aislados clínicos SASM y SARM con TSST. **(D)** Biofilm de los aislados clínicos SASM y SARM con PVL. Las barras negras indican el crecimiento total de aislados SASM, las rayadas indican el crecimiento total de aislados SARM y las barras de diferentes colores indican el biofilm de los distintos aislados clínicos productores de toxinas (leyenda) y controles no productores de toxinas (barras blancas).

**Tabla 14.** Cepas de *S. aureus* caracterizadas según sus factores de virulencia, formación de biofilm y serotipo capsular. También se indica el grupo de edad del paciente, el tipo de infección y el origen de la cepa.

| Cepa     | <i>mecA</i> | PVL | TSST | ETA | ETB | BIOFILM CV <sup>a</sup> | CPS | Edad       | Tipo de infección          | Origen cepa <sup>b</sup> |
|----------|-------------|-----|------|-----|-----|-------------------------|-----|------------|----------------------------|--------------------------|
| 60031/19 | -           | -   | -    | -   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Comunitaria                | Sangre                   |
| 60085/19 | -           | +   | -    | -   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | L-PL                     |
| 60032/20 | -           | +   | -    | -   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Intrahospitalaria          | LB                       |
| 60107/20 | -           | +   | -    | -   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | Sangre                   |
| 60041/19 | -           | -   | +    | -   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60025/18 | -           | +   | -    | -   | +   | B                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EH                       |
| 62600/15 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 5   | Pediátrico | Comunitaria                | EC                       |
| 60021/17 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Comunitaria                | EN                       |
| 60032/17 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EH                       |
| 60389/17 | -           | -   | -    | +   | -   | M                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60574/17 | -           | -   | -    | +   | -   | M                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60642/17 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Comunitaria                | Absceso                  |
| 60038/19 | -           | -   | -    | +   | -   | M                       | 5   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60040/19 | -           | -   | -    | +   | -   | M                       | 5   | Pediátrico | Comunitaria                | Necropsia                |
| 60221/19 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Intrahospitalaria+ (brote) | EC                       |
| 60223/19 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Intrahospitalaria+ (brote) | EN                       |
| 60225/19 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 8   | Adulto     | Intrahospitalaria+ (brote) | EN                       |
| 60228/19 | -           | -   | -    | +   | -   | MB                      | 8   | Pediátrico | Intrahospitalaria+ (brote) | EP                       |
| 60598/17 | -           | -   | -    | -   | +   | M                       | 5   | Pediátrico | Comunitaria                | GS                       |
| 60601/17 | -           | -   | -    | -   | +   | I                       | 5   | Pediátrico | Comunitaria                | Necropsia                |
| 60610/17 | -           | -   | -    | -   | +   | MB                      | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 61949/15 | -           | -   | -    | +   | +   | I                       | 8   | Adulto     | Intrahospitalaria          | EH                       |
| 61950/15 | -           | -   | -    | +   | +   | I                       | 8   | Pediátrico | Intrahospitalaria          | EH                       |
| 60020/17 | -           | -   | -    | +   | +   | M                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60295/17 | -           | -   | -    | +   | +   | M                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60207/18 | -           | -   | -    | +   | +   | B                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EN                       |
| 60404/18 | -           | -   | -    | +   | +   | I                       | 8   | Pediátrico | Comunitaria                | EH                       |
| 60433/18 | -           | -   | -    | +   | +   | I                       | 8   | Adulto     | Comunitaria                | Sangre                   |
| 60061/19 | +           | -   | -    | -   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Intrahospitalaria          | EH                       |
| 60001/19 | +           | +   | -    | -   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Comunitaria                | EH                       |
| 60039/20 | +           | +   | -    | -   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Intrahospitalaria          | Sangre                   |
| 60078/20 | +           | +   | -    | -   | -   | MB                      | 5   | Adulto     | Comunitaria                | Sangre                   |

|          |   |   |   |   |   |    |   |            |                   |         |
|----------|---|---|---|---|---|----|---|------------|-------------------|---------|
| 60093/20 | + | + | - | - | - | MB | 5 | Pediátrico | Comunitaria       | Absceso |
| 60033/19 | + | + | + | - | - | I  | 5 | Adulto     | Comunitaria       | EH      |
| 60443/19 | + | + | - | + | - | MB | 8 | Adulto     | Intrahospitalaria | EH      |
| 60533/18 | + | - | + | - | - | B  | 5 | Pediátrico | Comunitaria       | LCR     |
| 61615/14 | + | - | - | + | - | MB | 5 | Adulto     | Intrahospitalaria | EH      |
| 62822/15 | + | - | - | + | - | M  | 8 | Adulto     | Comunitaria       | Sangre  |
| 60335/19 | + | - | - | + | - | MB | 8 | Pediátrico | Comunitaria       | Sangre  |
| 60412/19 | + | - | - | + | - | MB | 5 | Adulto     | Comunitaria       | EH      |
| 60031/20 | + | - | - | + | - | MB | 8 | Pediátrico | Comunitaria       | EN      |
| 61754/14 | + | - | - | - | + | B  | 8 | Adulto     | Intrahospitalaria | Sangre  |
| 60574/19 | + | - | - | - | + | MB | 5 | Adulto     | Comunitaria       | EH      |

- a. MB, muy buen formador de biofilm ( $A_{595} \geq 3,5$ ); B, buen formador de biofilm ( $A_{595} \geq 3$ ); I, intermedio formador de biofilm ( $A_{595} > 2$  pero  $< 3$ ); M, mal formador de biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$ ).
- b. EC, exudado cutáneo; EH, exudado de herida; EN, exudado nasofaríngeo; EP, exudado perianal; GS, glándula suprarrenal; LB, lavado broncoalveolar; L-PL, líquido pleural; NP, necropsia pulmonar; LCR, líquido cefalorraquídeo.

En la **Tabla 14** se puede observar que todos los aislados clínicos con los que se trabajó pertenecían a los serotipos 5 y 8. La mayor parte de aislados SASM pertenecían al serotipo 8, siendo un 71,5% del total, mientras que la mayoría de aislados SARM pertenecían al serotipo 5 (66,7%). Por otro lado, se observó que el 64% de los aislados clínicos del serotipo 8 y el 77% de los aislados clínicos de serotipo 5 formaban buen o muy buen biofilm ( $A_{595} \geq 3$  y  $A_{595} \geq 3,5$ , respectivamente) (**Tabla 14**). En relación a si los aislados procedían de pacientes pediátricos o adultos, el 61,5% de los aislados clínicos pediátricos y el 76,5% de los de adultos formaban buen o muy buen biofilm aunque en estos últimos hay que tener en cuenta que la mayoría de aislados SARM analizados procedían de adultos (**Tabla 14**). Según el tipo de infección, la mayoría de los aislados eran de origen comunitarios (31 de 43 aislados), aunque en líneas generales un porcentaje elevado de las cepas formaron buen o muy buen biofilm (61,3% en aislados comunitarios y 83,3% en aislados intrahospitalarios). Respecto al origen de la cepa, no se encontró relación alguna entre formación de biofilm y origen de la cepa, pudiendo deberse a la gran diversidad de localizaciones de donde se aisló el microorganismo.

### 3.3. Caracterización de la matriz de los biofilms de aislados clínicos de *S. aureus*

Al no encontrar una asociación clara entre formación de biofilm y el factor de virulencia expresado (toxinas estudiadas), se decidió analizar más a fondo las matrices de los biofilms de los aislados clínicos. Para ello, se analizó el patrón bimodal de formación de biofilm de aislados clínicos SASM y SARM que producen ETA, ya que algunos formaban muy buen biofilm ( $A_{595} \geq 3,5$ ) y, otros, mal biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$ ) (**Figura 31**). Con este fin, seleccionamos aislados que sintetizaran ETA y que formasen buen o mal biofilm teniéndose en cuenta, además, el serotipo capsular. Asimismo, se incluyeron las cepas 60031/19 y 60061/19 como controles SASM y SARM, respectivamente (**Tabla 15**).

Para analizar las matrices de los aislados clínicos seleccionados se realizaron experimentos de inhibición del biofilm, donde se añadía la enzima o el compuesto desde el inicio y se incubaban durante 24 h a 37 °C, mientras que en los experimentos de disgregación del biofilm, se incubó el biofilm durante 23 h a 37 °C, realizando un lavado con H<sub>2</sub>O destilada seguido de tratamiento del biofilm durante 1 h a 37 °C. El análisis de estos tratamientos se realizó en placas multipocillo de poliestireno y tinción con CV.

**Tabla 15.** Selección de aislados clínicos de *S. aureus* para la caracterización de la matriz.

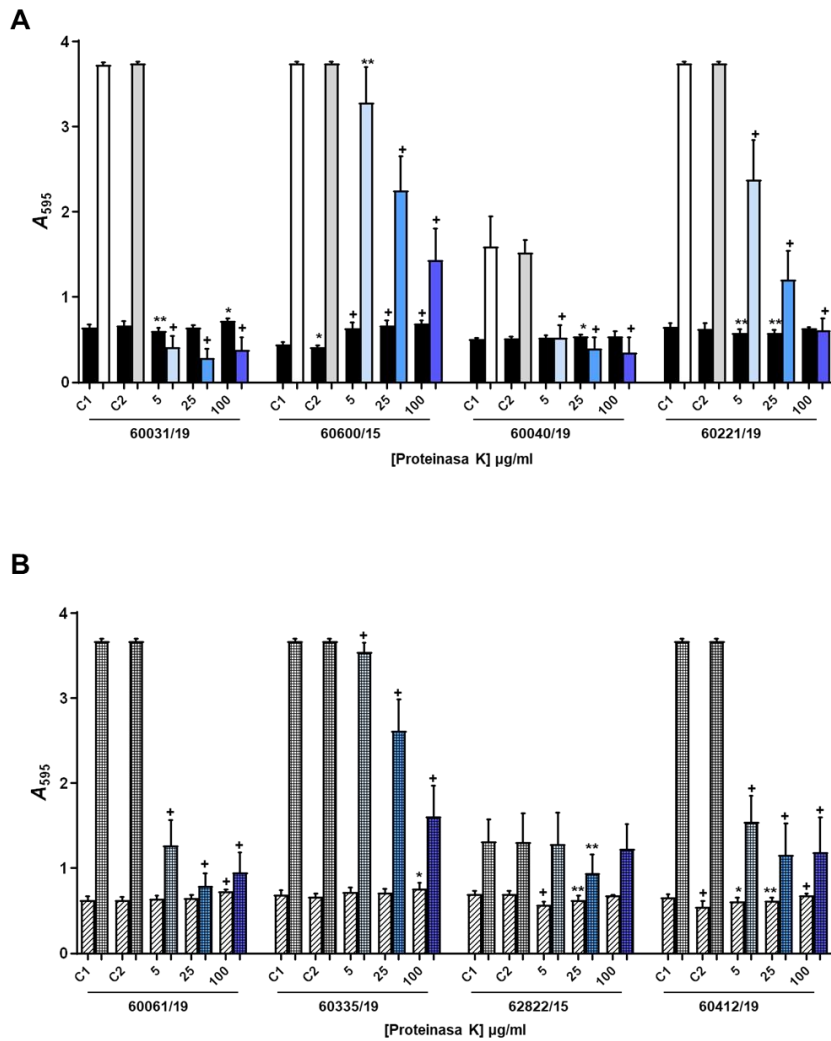
| Aislados SASM |                         |                   |                      | Aislados SARM |                         |                   |                      |
|---------------|-------------------------|-------------------|----------------------|---------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| Nº cepa       | Biofilm CV <sup>a</sup> | Serotipo capsular | Factor de virulencia | Nº cepa       | Biofilm CV <sup>a</sup> | Serotipo capsular | Factor de virulencia |
| 60031/19      | MB                      | 5                 | -                    | 60061/19      | MB                      | 5                 | -                    |
| 62600/15      | MB                      | 5                 | ETA                  | 60335/19      | MB                      | 8                 | ETA                  |
| 60040/19      | M                       | 5                 | ETA                  | 62822/15      | M                       | 8                 | ETA                  |
| 60221/19      | MB                      | 8                 | ETA                  | 60412/19      | MB                      | 5                 | ETA                  |

<sup>a</sup> MB, muy buen formador de biofilm ( $A_{595} \geq 3,5$ ); M, mal formador de biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$ ).

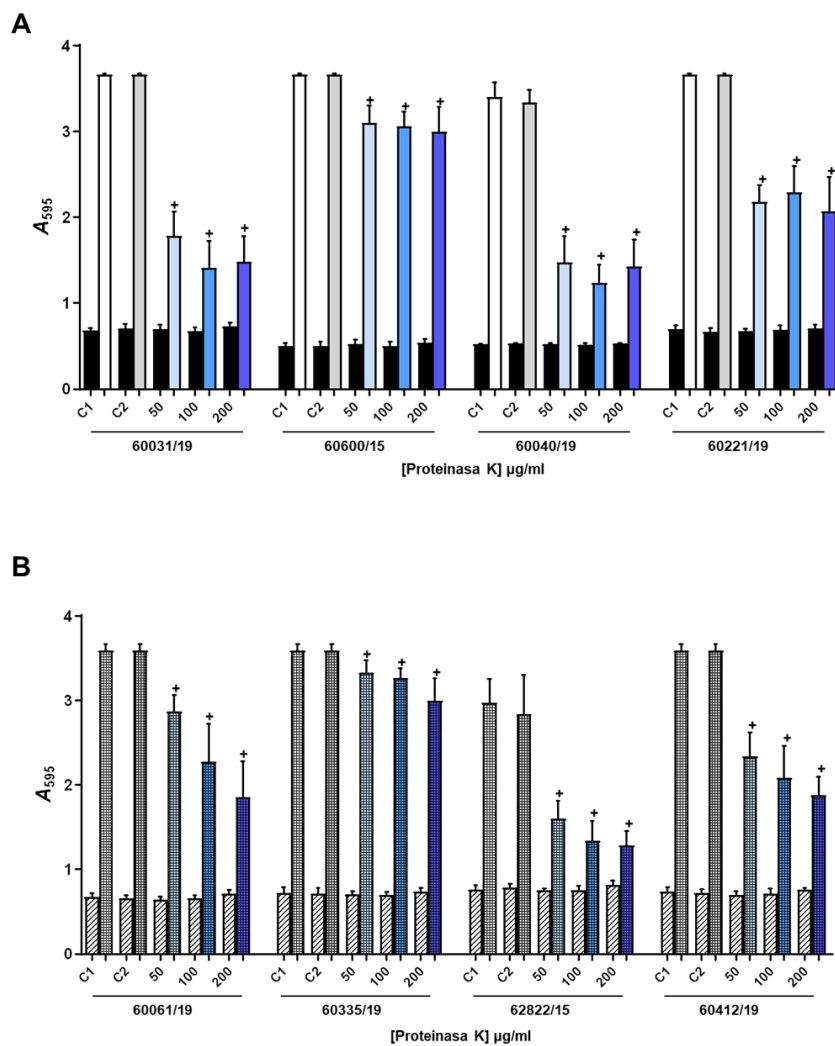
Lo primero que se analizó fue el componente proteico de las matrices de los aislados clínicos, realizando ensayos de inhibición y disgregación del biofilm con proteinasa K

(**Figuras 32 y 33**). La proteinasa K es una proteasa que escinde los enlaces peptídicos de aminoácidos alifáticos, aromáticos e hidrofóbicos. Esta enzima es de uso común a la hora de estudiar el componente proteico de los biofilms bacterianos (Moscoso *et al.*, 2006, Chaignon *et al.*, 2007) y se había visto su importancia en biofilms de *S. aureus*, pero variaba en función de la composición de los mismos (Sugimoto *et al.*, 2018). La inhibición con proteinasa K afectó a todos los aislados clínicos menos al SARM 62822/15, donde sólo se vio efecto significativo con 25 µg/ml (**Figura 32**). Los resultados confirman que el componente proteico de la matriz es esencial para la formación del biofilm de la mayoría de los aislados clínicos. Los ensayos de disgregación del biofilm mostraron un efecto marcado de la proteinasa K en todos los aislados clínicos, por lo que el componente proteico de las matrices juega un papel crítico en el mantenimiento del biofilm (**Figura 33**)

RESULTADOS



**Figura 32.** Inhibición del biofilm de los aislados clínicos de *S. aureus* con proteinasa K. Los biofilms fueron tratados con proteinasa K al comienzo de la formación del biofilm (tiempo cero) e incubados durante 24 h a 37 °C. **(A)** Inhibición de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras en diferentes tonalidades de azul, el biofilm formado en presencia de distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Inhibición de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y, las barras cuadrículadas en diferentes tonalidades de azul, el biofilm formado en presencia de distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01; +*P*<0.001). C1, control del biofilm en ausencia de proteinasa K; C2, control del tampón.

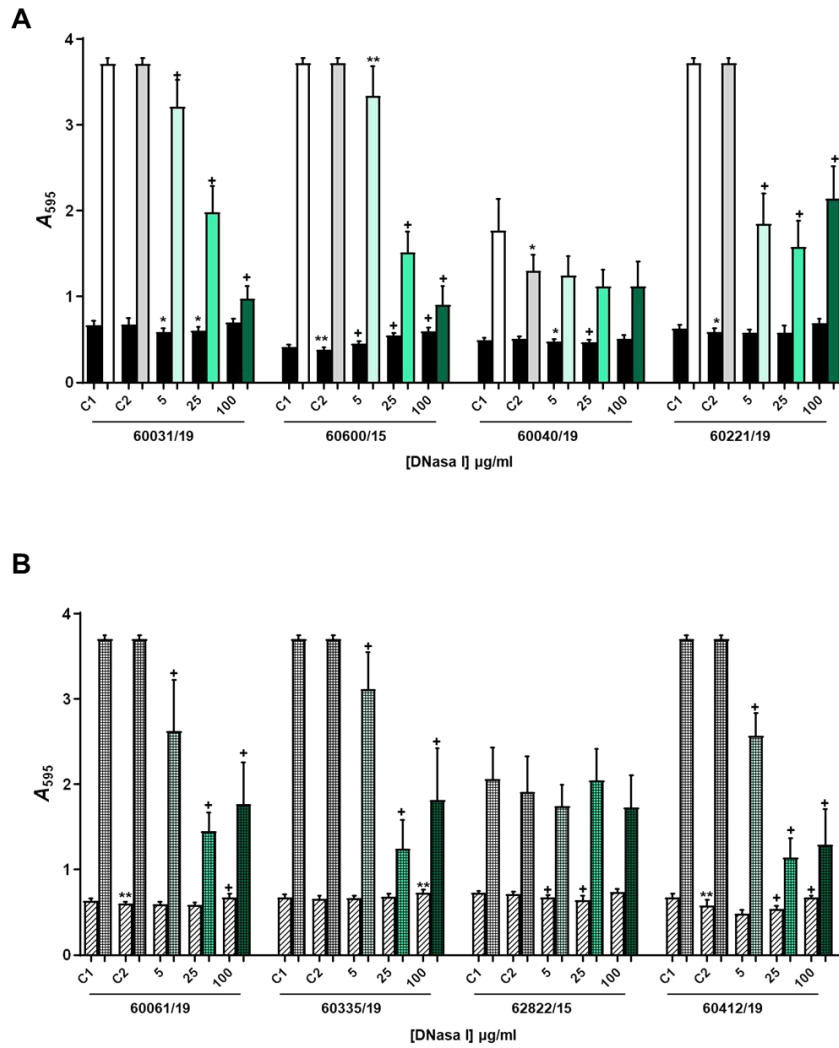


**Figura 33.** Disgregación del biofilm de los aislados clínicos de *S. aureus* con proteinasa K. Los biofilms fueron incubados durante 23 h a 37 °C y tratados con la enzima durante 1 h a la misma temperatura. **(A)** Disgregación de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras en diferentes tonalidades de azul, el biofilm tratado con distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Disgregación de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y, las barras cuadrículadas en diferentes tonalidades de azul, el biofilm tratado con distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.001). C1, control del biofilm en ausencia de proteinasa K; C2, control del tampón.

Otro aspecto que se analizó fue la presencia de ADN extracelular (ADNe) en los biofilms utilizando DNasa I. La DNasa I se ha utilizado ampliamente en el estudio de las matrices de los biofilms de *S. aureus*, tanto en ensayos de inhibición como de disgregación del biofilm (Izano *et al.*, 2008, Houston *et al.*, 2011). Además, estudios previos habían mostrado la importancia del componente de ADNe (Sugimoto *et al.*, 2018) tanto para la formación como para el mantenimiento de los biofilms de *S. aureus*, aunque, normalmente, se asociaba este efecto al tipo de biofilm [*ica*-dependiente o *ica*-independiente (Houston *et al.*, 2011)].

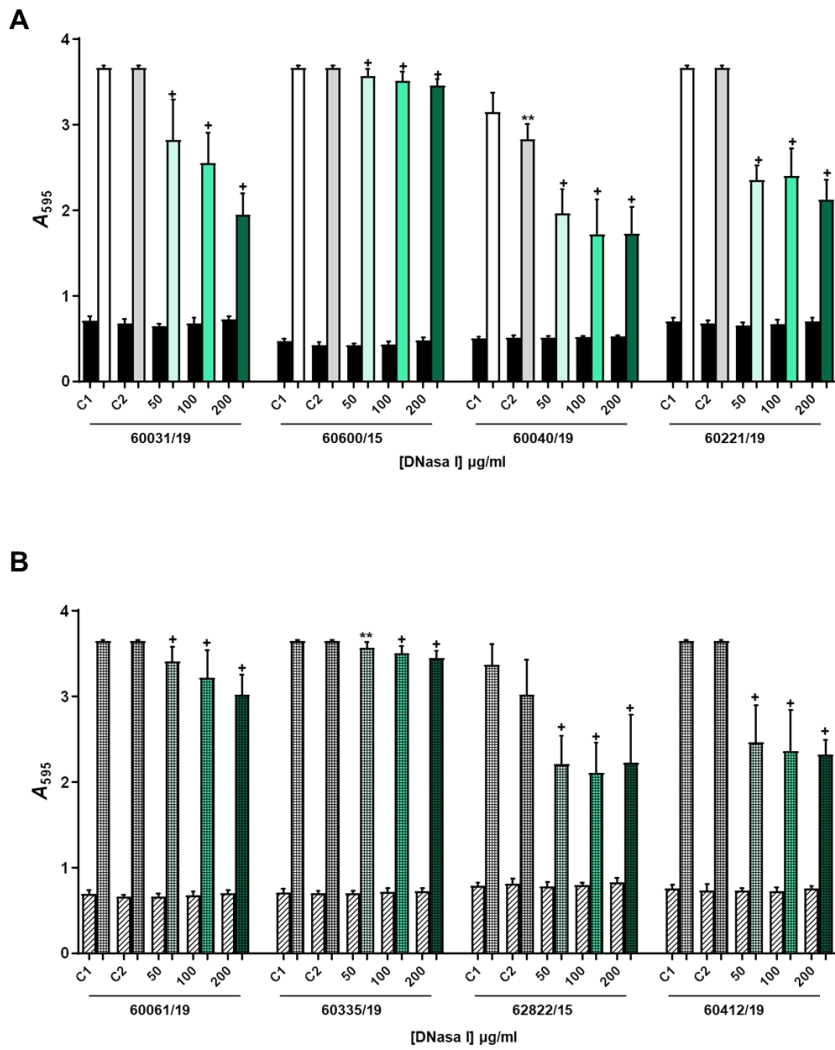
En la **Figura 34**, se puede observar la inhibición del biofilm con DNasa I de los diferentes aislados SASM y SARM. Destaca el efecto de esta enzima en los aislados clínicos muy buenos formadores de biofilm, pero no se apreció ningún efecto de la DNasa I incluso a altas concentraciones en la inhibición del biofilm de las cepas SASM (60040/19) y SARM (62822/15) que eran malas formadoras de biofilm (**Figura 34**). Además, en los aislados 60221/19 (SASM), 60061/19 (SARM), 60335/19 (SARM) y 60412/19 (SARM) se veía más efecto con la concentración intermedia de 25 µg/ml que con la concentración máxima utilizada (100 µg/ml) (**Figura 34**). Estos resultados indican que la presencia de ADNe es esencial para la formación de biofilm de aquellos aislados considerados como buenos formadores de biofilm, mientras que no parece tener un papel relevante en la formación de biofilm de los *S. aureus* considerados como malos formadores de biofilm.

En los estudios de disgregación de biofilm con DNasa I (**Figura 35**) se observa disgregación del biofilm de todos los aislados clínicos seleccionados, aunque esta disgregación fue menor que la producida por la proteinasa K (**Figuras 33 y 35**). Estos resultados confirman que el ADNe juega también un papel esencial en el mantenimiento de los biofilms aunque, en alguno de los aislados, puede tener menor relevancia que el componente proteico.



**Figura 34.** Inhibición del biofilm de los aislados clínicos de *S. aureus* con DNasa I. Los biofilms fueron tratados con la enzima desde el tiempo inicial e incubados durante 24 h a 37 °C. **(A)** Inhibición de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras en diferentes tonalidades de verde, el biofilm formado en presencia de distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Inhibición de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y las barras cuadrículadas en diferentes tonalidades de verde, el biofilm formado en presencia de distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; + $P < 0.001$ ). C1, control del biofilm en ausencia de DNasa I; C2, control del tampón.

RESULTADOS

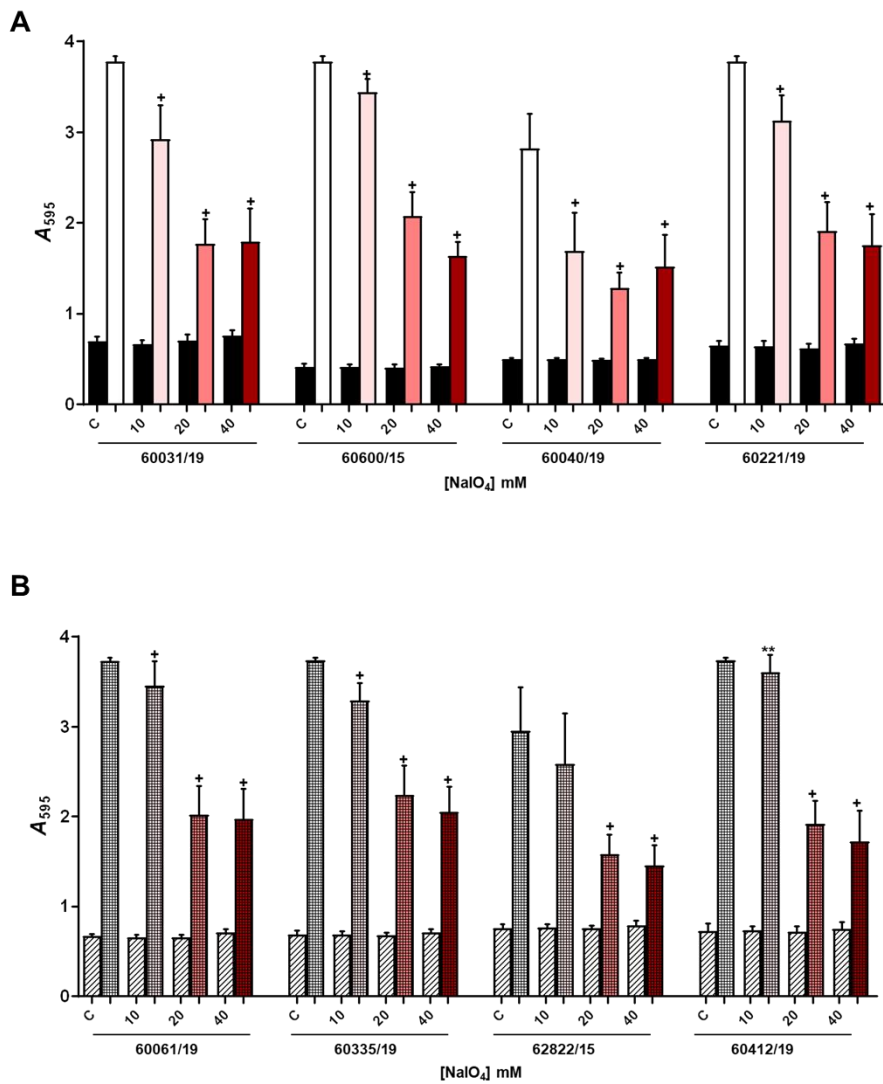


**Figura 35.** Disgregación del biofilm de los aislados clínicos de *S. aureus* con DNasa I. Los biofilms fueron incubados durante 23 h a 37 °C y tratados con la enzima durante 1 h a la misma temperatura. **(A)** Disgregación de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras en diferentes tonalidades de verde, el biofilm tratado con distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Disgregación de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y las barras cuadrículadas en diferentes tonalidades de verde, el biofilm tratado con distintas cantidades de enzima. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.001$ ). C1, control del biofilm en ausencia de DNasa I; C2, control del tampón.

Por último, se estudió el componente polisacárido de la matriz de los biofilms de los aislados clínicos de *S. aureus* ya que se ha demostrado la existencia de exopolisacáridos en la matriz del biofilm de *S. aureus* denominado PIA o PNAG (Mack *et al.*, 1996, Maira-Litrán *et al.*, 2002). Para analizar la presencia de exopolisacárido en estos biofilms se utilizó metaperiodato sódico ( $\text{NaIO}_4$ ) que ya había sido utilizado previamente en los biofilms de *S. aureus* (Seidl *et al.*, 2008, Liesse Iyamba *et al.*, 2011). Este compuesto oxidante hidroliza los enlaces carbono-carbono cuando poseen un átomo de oxígeno, ya sea en forma de grupo hidroxilo o carbonilo. Esto no sólo afectará a los polisacáridos, sino que también tiene efecto sobre glicoproteínas. Por todo esto, el  $\text{NaIO}_4$  ha sido utilizado para determinar la presencia de polisacáridos en las EPS de biofilms formados por diferentes especies bacterianas (Frank y Patel, 2007, Domenech *et al.*, 2013a).

Los resultados de la **Figura 36**, muestran que el  $\text{NaIO}_4$  fue capaz de disgregar el biofilm de todos los aislados clínicos ensayados, tanto SASM y como SARM, sobre todo a concentraciones  $\geq 20$  mM. Estos hallazgos indican la existencia de algún tipo de componente polisacárido en las EPS de estos biofilms, aunque no se puede confirmar que se trate de PIA. Para esto haría falta utilizar la glicósido hidrolasa dispersina B (Ramasubbu *et al.*, 2005, Izano *et al.*, 2008).

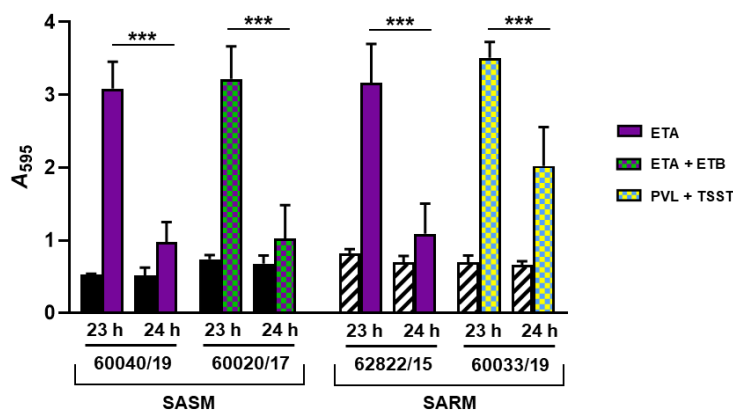
RESULTADOS



**Figura 36.** Disgregación del biofilm de los aislados clínicos de *S. aureus* con NaIO<sub>4</sub>. Los biofilms fueron incubados durante 23 h a 37 °C y tratados con el compuesto durante 2 h a la misma temperatura. **(A)** Disgregación de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras en diferentes tonalidades de rojo, el biofilm tratado con distintas cantidades de NaIO<sub>4</sub>. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Disgregación de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y las barras cuadrículadas en diferentes tonalidades de rojo, el biofilm tratado con distintas cantidades de NaIO<sub>4</sub>. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.001). C1, control del biofilm en ausencia de NaIO<sub>4</sub>.

### 3.4. Evolución del biofilm de aislados clínicos de *S. aureus*

Al realizar los tratamientos de los biofilms de los aislados clínicos de *S. aureus* se observa una diferencia notable en la biomasa cuantificada por CV ( $A_{595}$ ) de los aislados que se consideraron como malos formadores de biofilm a las 24 h en el análisis inicial. Si se compara la biomasa de los controles de las cepas 60040/19 y 62822/15 tanto en las inhibiciones (**Figuras 32 y 34**) como en las disgregaciones del biofilm (**Figuras 33, 35 y 36**) se pueden observar variaciones de más de una unidad de  $A_{595}$ . La única diferencia de estos procedimientos de biofilm es que en los tratamientos de inhibición se exponen 24 h a 37 °C seguidas y en los de disgregación son 23 h a 37 °C + 1 o 2 h a 37 °C de incubación con la enzima o el compuesto (en el caso de los controles será con H<sub>2</sub>O (C1) o con H<sub>2</sub>O + tampón de la enzima (C2)). En consecuencia, se consideró como muy poco probable que fuese la exposición a H<sub>2</sub>O durante esa hora lo que afectase al biofilm y formase una mayor biomasa. Para ver si eran los diferentes tiempos de incubación iniciales, se seleccionaron cuatro aislados clínicos que formaban mal biofilm a las 24 h ( $A_{595} \leq 1.5$ ) (**Figura 30**) y se realizaron ensayos en los que se incubaron los biofilms de estos aislados clínicos a 23 y 24 h a 37 °C (**Figura 37**).

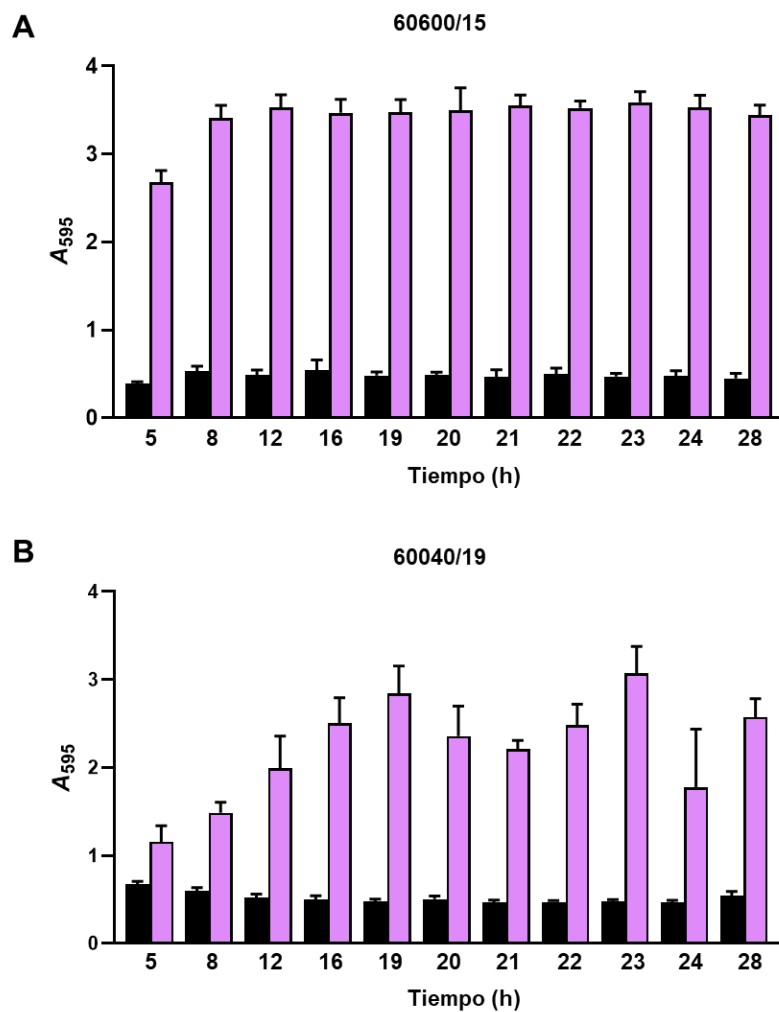


**Figura 37.** Formación del biofilm de aislados clínicos de *S. aureus* considerados como malos formadores de biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$ ) a dos tiempos diferentes. Se escogieron dos cepas SASM y dos cepas SARM y se cuantificó su capacidad de formación de biofilm a 23 y 24 h. Las barras negras indican el crecimiento total (bacterias adheridas y no adheridas) de aislados SASM y las barras rayadas indican el crecimiento total (bacterias adheridas y no adheridas) de aislados

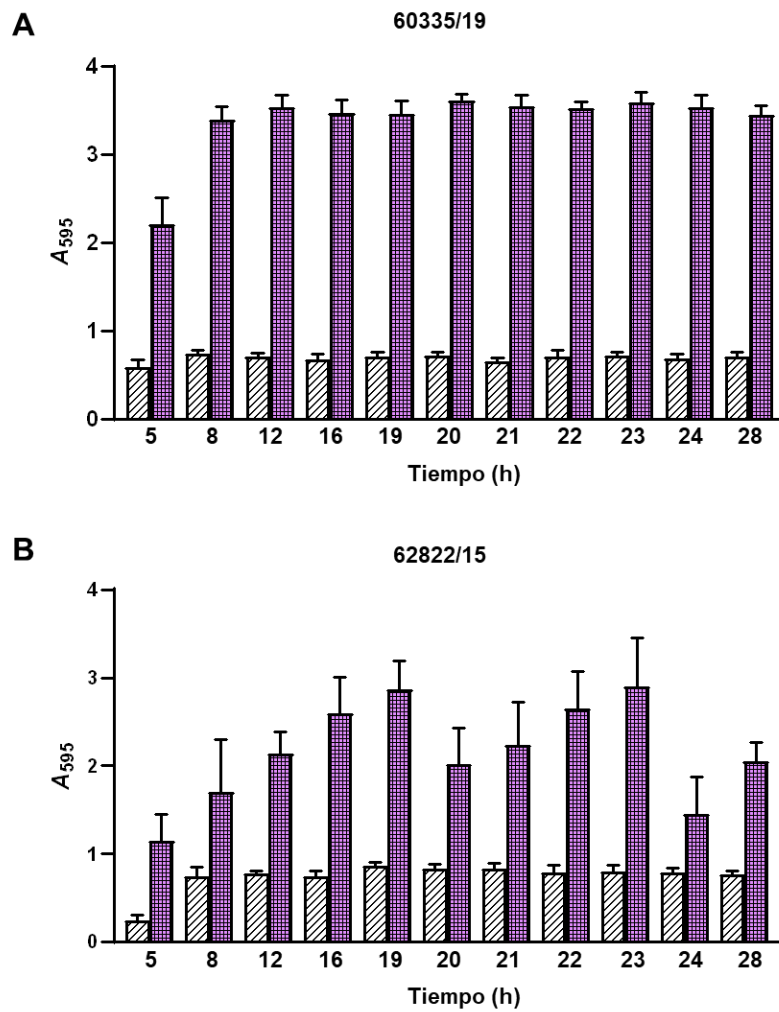
SARM. Las barras de diferentes colores indican el biofilm de los distintos aislados clínicos productores de toxinas (leyenda). Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos ( $t$  de Student de dos colas: \*\*\* $P < 0.001$ ).

En los cuatro aislados clínicos considerados como malos formadores de biofilm a las 24 h, se pudo comprobar que, al incubarlos 23 h, había mucha mayor biomasa de biofilm (**Figura 37**). Este cambio tan brusco en una hora de incubación fue llamativo por lo que se decidió estudiar más a fondo la evolución de cuatro aislados clínicos. Se seleccionaron dos parejas de aislados clínicos SASM (60600/15 y 60040/19) y SARM (60335/19 y 62822/15), y de cada pareja se escogieron un aislado muy buen formador de biofilm ( $A_{595} \geq 3,5$ ) a las 24 h (60600/15 y 60335/19) y mal formador de biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$ ) a las 24 h (60040/19 y 62822/15).

En primer lugar, se analizó el biofilm a diferentes tiempos, desde 5 h (un biofilm de *S. aureus* temprano) hasta 28 h de incubación (un biofilm de *S. aureus* maduro) (**Figuras 38 y 39**). En los dos aislados SASM se puede observar que el aislado considerado como buen formador de biofilm, es capaz de formar un biofilm muy marcado desde pases tempranas (5 h), estabilizándose a partir de las 8 h y sin sufrir cambios en las 28 h estudiadas (**Figura 38A**). Por el contrario, en el aislado considerado como mal formador de biofilm se apreció mucho menos biofilm en las 12 primeras horas hasta alcanzar un pico de biofilm a las 16-19 h, donde sufre una caída de biomasa a las 20-21 h que vuelve a repuntar hasta alcanzar un pico a las 23 h (**Figura 38B**). Aquí se vuelve a observar esa diferencia tan brusca entre 23 vs. 24 h que se da en este biofilm. En los aislados SARM se encontró el mismo fenómeno, donde la buena formadora de biofilm a partir de las 5 h forma ya su máximo de biofilm hasta las 28 h estudiadas (**Figura 39A**) mientras que la mala formadora alcanza un pico a las 16-19 h, disminuyendo a las 20 h y volviendo a repuntar hasta las 23 h con una notable caída a las 24 h (**Figura 39B**). Estas diferencias de 19 vs. 20 h y 23 vs. 24 h en las cepas malas formadoras de biofilm 60040/19 y 62822/15 fueron estadísticamente significativas (\*\*\* $P < 0.001$ , test  $t$  de Student de dos colas).



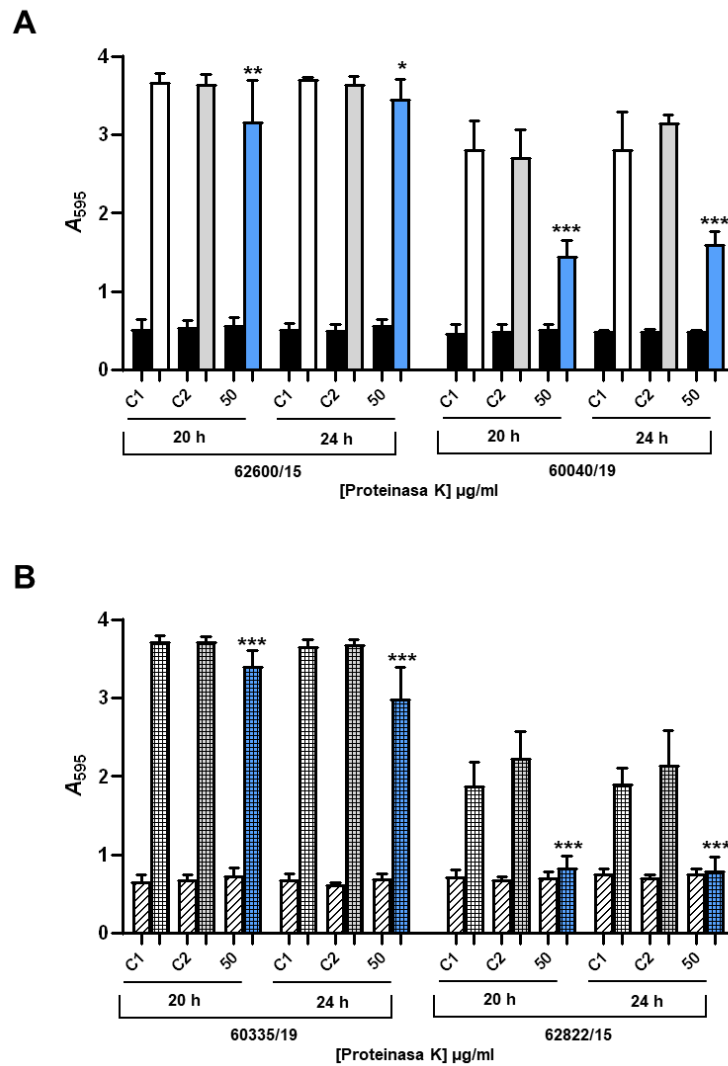
**Figura 38.** Evolución del biofilm de dos aislados SASM de *S. aureus*. Se analizó la evolución del biofilm de una cepa buena formadora de biofilm a las 24 h (62600/15) (**A**) y una mala formadora de biofilm a las 24 h (60040/19) (**B**). Los biofilms se incubaron de 5 a 28 h a 37 °C y se analizó su biomasa por tinción con CV ( $A_{595}$ ). Las barras negras representan el crecimiento total (bacterias en estado planctónico y en biofilm) y las violetas el biofilm formado. Se muestran las barras de desviación estándar.



**Figura 39.** Evolución del biofilm de dos aislados SARM de *S. aureus*. Se analizó la evolución del biofilm de una cepa buena formadora de biofilm a las 24 h (62600/15) (**A**) y una mala formadora de biofilm a las 24 h (60040/19) (**B**). Los biofilms se incubaron de 5 a 28 h a 37 °C y se analizó su biomasa por tinción con CV ( $A_{595}$ ). Las barras rayadas representan el crecimiento total y las barras cuadrículadas violetas el biofilm formado. Se muestran las barras de desviación estándar.

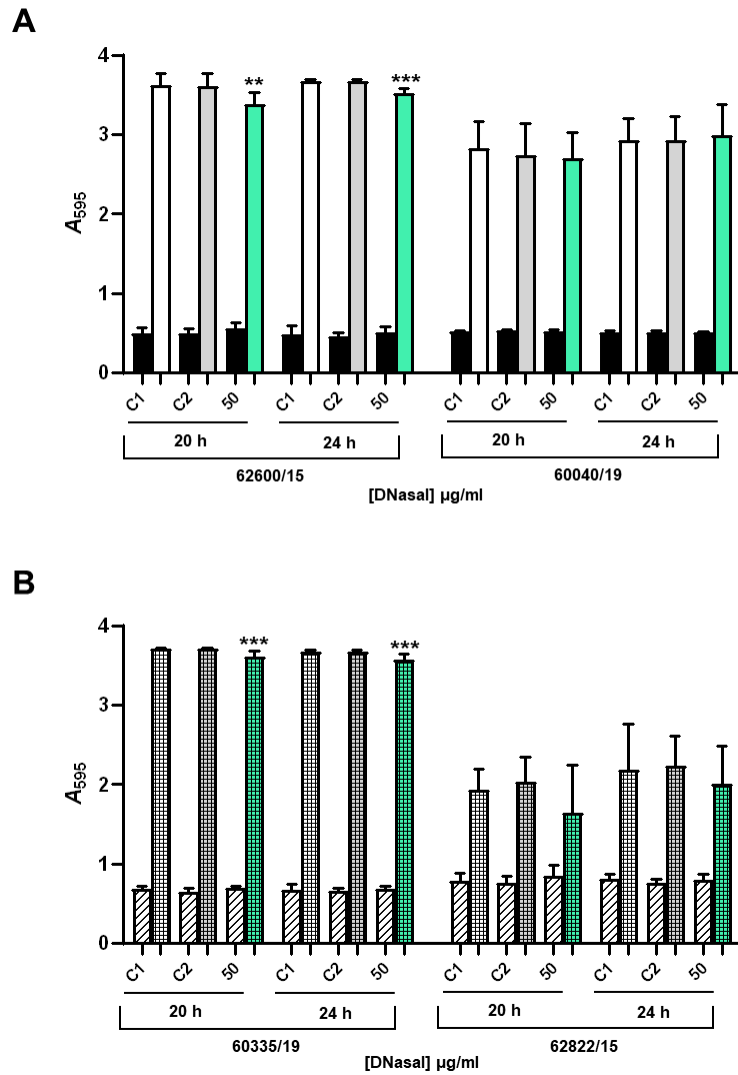
Una vez se observaron estos patrones en los biofilms de los aislados clínicos considerados como peores formadores de biofilm ( $A_{595} \leq 1.5$  a 24 h) se caracterizó más a fondo sus matrices en los tiempos en los que el biofilm tiene menor biomasa (20 y 24 h), ya que se habían realizado las disgregaciones de estos aislados clínicos a las 23 h. Sobre esta base, se decidió repetir los mismos tratamientos con proteinasa K, DNasa I y  $\text{NaIO}_4$ , pero realizando una incubación de 20 o 24 h + 1 o 2 h de tratamiento a 37 °C.

Al tratar los biofilms de los cuatro aislados clínicos con proteinasa K se pudo observar que este compuesto tenía efecto frente a todos ellos tanto a las 20 h como a las 24 h (**Figura 40**). Estos resultados confirman la importancia de las proteínas extracelulares para el mantenimiento en los aislados considerados como buenos formadores de biofilm pero también indican que son importantes para mantener el biofilm de los aislados considerados como malos formadores de biofilm cuando su biomasa es menor a las 20 h y 24 h (**Figura 40**).



**Figura 40.** Disgregación de los biofilms de los aislados clínicos de *S. aureus* a diferentes tiempos con proteinasa K. Los biofilms fueron incubados durante 20 o 24 h a 37 °C y tratados con la enzima durante 1 h a la misma temperatura. **(A)** Disgregación de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras azules, el biofilm tratado con 50 µg/ml de proteinasa K. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Disgregación de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y las barras con cuadrículas en azul, el biofilm tratado con 50 µg/ml de proteinasa K. Las barras blancas y grises con cuadrículas, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001). C1, control del biofilm en ausencia de proteinasa K; C2, control del tampón.

El tratamiento de los biofilms con DNasa I, confirmó que este compuesto seguía teniendo efecto en los aislados clínicos considerados como buenos formadores de biofilm SASM y SARM, pero no tenía ningún efecto sobre los aislados clínicos que eran malos formadores de biofilm (**Figura 41**). Este nulo efecto de la DNasa I a las 20 h y 24 h en los aislados considerados como malos formadores de biofilm contrasta con el efecto observado a las 23 h, donde la DNasa I sí que disgregaba el biofilm (**Figura 35**).

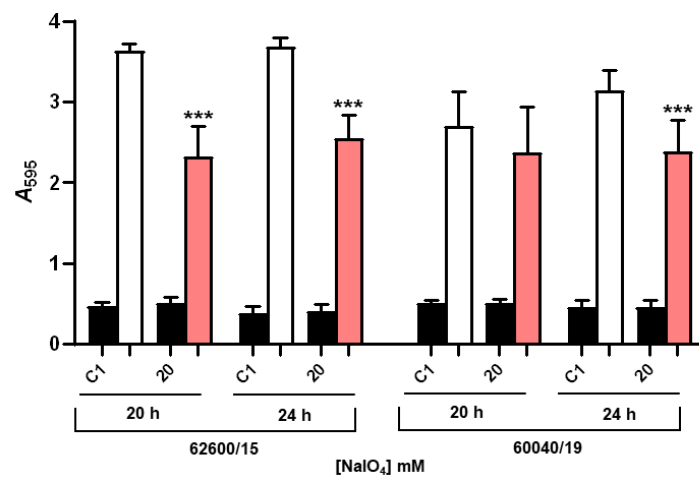


**Figura 41.** Disgregación de los biofilms de los aislados clínicos de *S. aureus* a diferentes tiempos con DNasa I. Los biofilms fueron incubados durante 20 h o 24 h a 37 °C y tratados con la enzima durante 1 h a la misma temperatura. **(A)** Disgregación de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y, las verdes, el biofilm tratado con 50 µg/ml de DNasa I. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Disgregación de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y las cuadrículadas y verdes, el biofilm tratado con 50 µg/ml de DNasa I. Las barras blancas y grises cuadrículadas, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001). C1, control del biofilm en ausencia de DNasa I; C2, control del tampón.

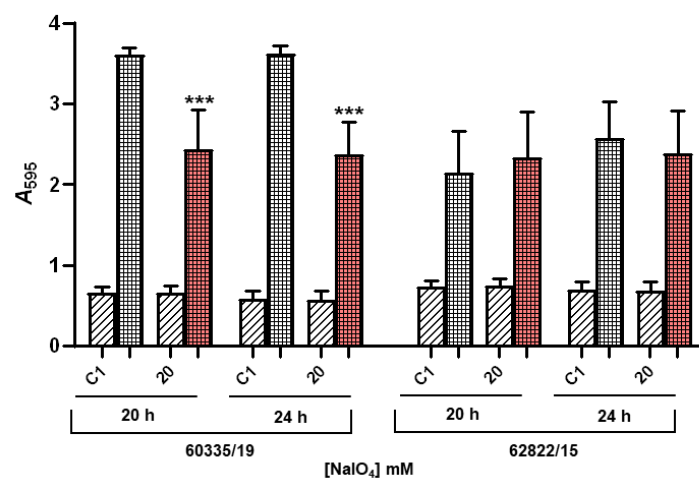
Por último, se trataron los biofilms con  $\text{NaIO}_4$  para observar la importancia el componente de exopolisacárido en estos tiempos de exposición. En la **Figura 42** se observa que el  $\text{NaIO}_4$  tiene efecto en los aislados considerados como buenos formadores de biofilm pero no en los aislados que eran malos formadores de biofilm, a excepción del aislado 60040/19 a las 24 h. Al igual que con la DNasa I, esto contrasta con el efecto disgregante visto en estos aislados a las 23 h. Si se analizan en conjunto estos resultados, se puede afirmar que los componentes de la matriz extracelular del biofilm son variables en función del tiempo.

RESULTADOS

**A**



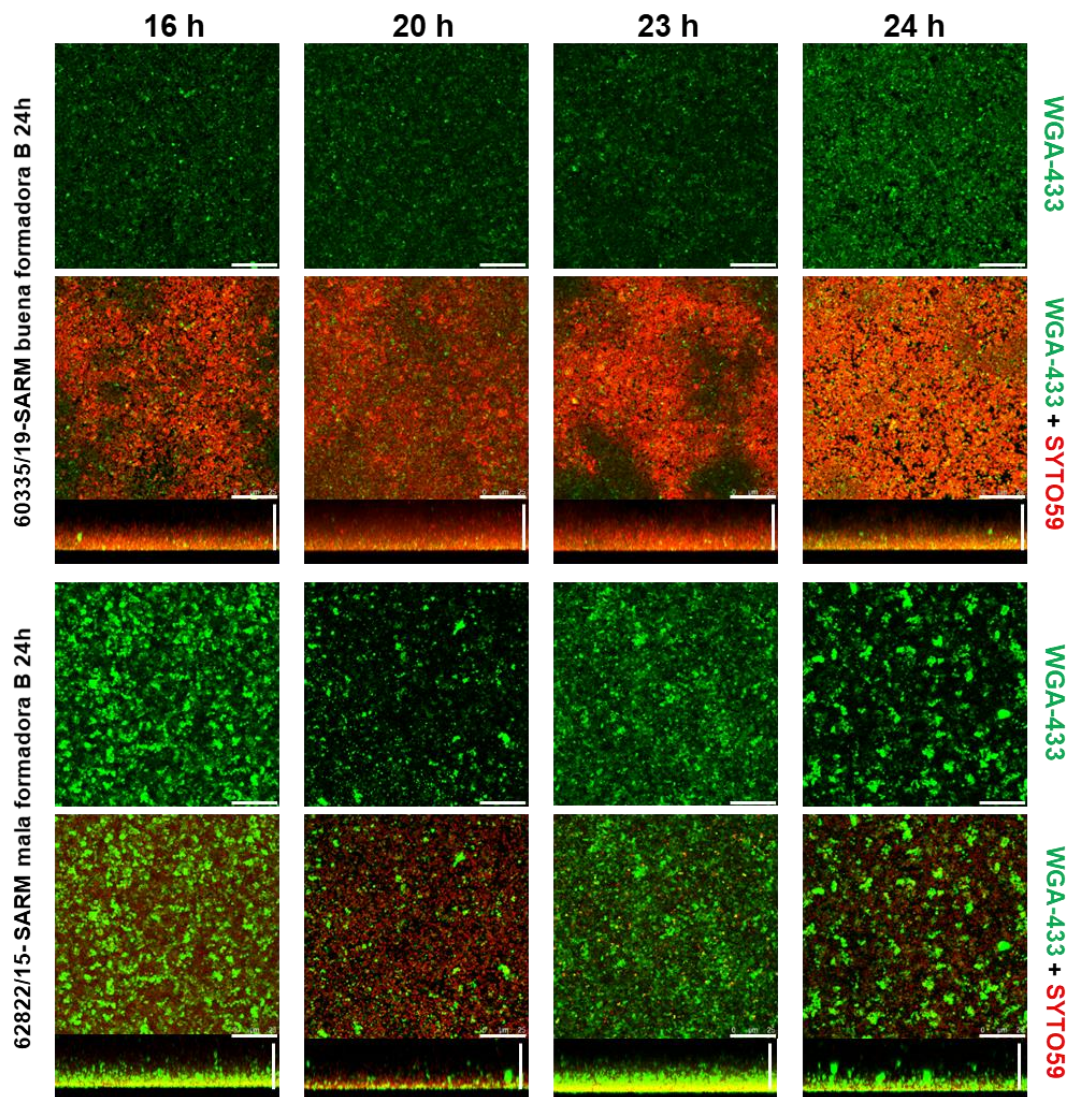
**B**



**Figura 42.** Disgregación de los biofilms de los aislados clínicos de *S. aureus* a diferentes tiempos con NaIO<sub>4</sub>. Los biofilms fueron incubados durante 20 o 24 h a 37 °C y tratados con el compuesto durante 2 h a la misma temperatura. **(A)** Disgregación de los aislados SASM. Las barras negras indican crecimiento total y las barras rosas, el biofilm tratado con 20 mM de NaIO<sub>4</sub>. Las barras blancas y grises, representan el biofilm formado por los controles. **(B)** Disgregación de los aislados SARM. Las barras rayadas indican el crecimiento total y, las cuadrículas rosas, el biofilm tratado con 20 mM de NaIO<sub>4</sub>. Las barras blancas y grises cuadrículas, representan el biofilm formado por los controles. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\**P*<0.001). C1, control del biofilm en ausencia de NaIO<sub>4</sub>.

Además de las aproximaciones experimentales mostradas anteriormente, se utilizó CLSM para estudiar con mayor detalle la evolución del biofilm de estos aislados. Para ello, se escogió una pareja de cepas SARM (60335/19 y 62822/15) y se utilizó SYTO59 o SYTO9 para teñir las células del biofilm, la lectina WGA (*wheat germ agglutinin*) conjugada a un fluorocromo y DDAO para observar los componentes de la matriz. Estos ensayos se realizaron a tiempos en los que se aprecian mayores diferencias en la cepa considerada como mala formadora de biofilm (16 y 23 h) y donde decae la biomasa del biofilm (20 y 24 h).

Las lectinas son proteínas que se unen específicamente y de manera reversible a un carbohidrato, pero sin alterar la estructura covalente de los enlaces glicosídicos reconocidos. El motivo de usar la lectina WGA (obtenida de *Triticum vulgare*) es porque reconoce específicamente residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido acetilneuramínico (Neu5Ac) (Sharon, 2007). En la **Figura 43** se puede observar que la lectina WGA-Alexa 433 es capaz de teñir el exopolisacárido de los dos biofilms de los aislados clínicos a distintos tiempos. En la cepa SARM 60335/19 (buena formadora de biofilm,  $A_{595} \geq 3,5$ ) se aprecia que la presencia de exopolisacárido es constante durante las cuatro horas estudiadas y mantiene un comportamiento homogéneo a lo largo de la evolución del biofilm, a excepción de las 24 h donde se ve mucha mayor señal (**Figura 43**). Por el contrario, en la cepa 62822/15 (mala formadora de biofilm) se observa un patrón evidente con elevada cantidad de polisacárido a las 16 h y 23 h y mucho menos a las 20 y 24 h. Además, se observaron cúmulos de la lectina en ciertas zonas del biofilm, sin mostrar una distribución homogénea de este polisacárido a las 20-24 h en los que incluso se apreciaban zonas libres de marcaje (**Figura 43**). Respecto a cantidad de células en el biofilm (marcaje con SYTO59), se puede observar que el biofilm de la cepa considerada como buena formadora es mucho más grueso y más estructurado, apreciándose acúmulos de células y zonas sin bacteria que contienen exopolisacárido. Por el contrario, el biofilm de la cepa 62822/15 fue mucho más débil, se observa una menor cantidad de células que parece mantenerse constante en los diferentes tiempos (**Figura 43**). Se realizó la misma observación utilizando la combinación WGA-Alexa 594 y SYTO9 obteniendo los mismos resultados (datos no mostrados).

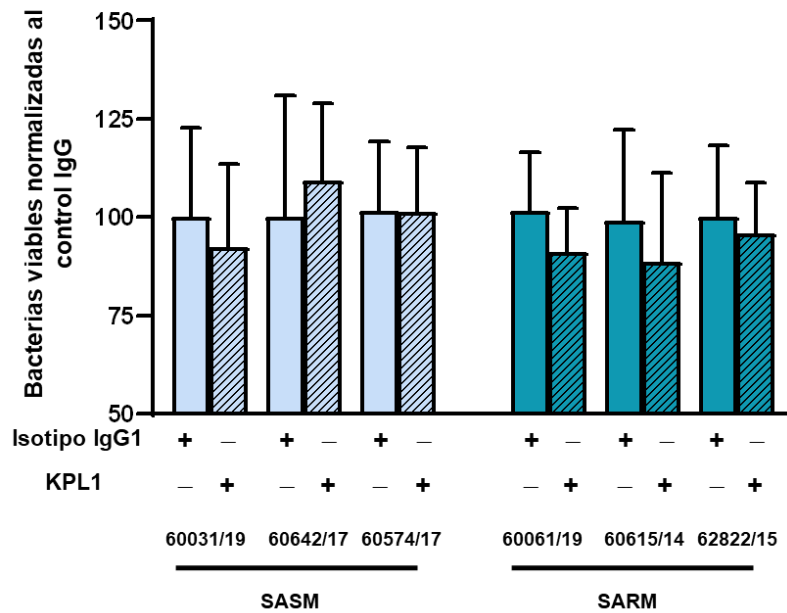


**Figura 43.** Visualización del componente de exopolisacárido de la matriz del biofilm de los aislados clínicos SARM por CLSM. Los biofilms se incubaron a diferentes tiempos (16, 20, 23, o 24 h) a 37 °C. Las bacterias se tiñeron con SYTO59 (fluorescencia en rojo) y el componente exopolisacárido con WGA-433 (fluorescencia en verde). Proyecciones x-y (captura de imágenes a intervalos de 0,5 μm) y x-z (captura de imágenes a intervalos de 5,0 μm). Las barras indican la escala, 25 μm. B, biofilm.

Se intentó observar el ADN de los biofilms mediante tinción con fosfato de DDAO ((9H-(1,3-Dicloro-9,9-Dimetilacridina-2-uno-7-il) fosfato). El DDAO tiñe el ADN, no penetra en las bacterias debido a su masa molecular y es fácil de detectar (Dominiak *et al.*, 2011). Además, ya ha sido utilizado previamente para caracterizar el ADN en biofilms de otros microorganismos (Allesen-Holm *et al.*, 2006, Dominiak *et al.*, 2011, Domenech *et al.*, 2013a, Domenech *et al.*, 2016). En el caso de los dos aislados clínicos de *S. aureus* no se logró observar ningún tipo de señal a las mismas horas indicadas anteriormente (datos no mostrados).

### 3.5. Evasión del sistema inmune en *S. aureus*

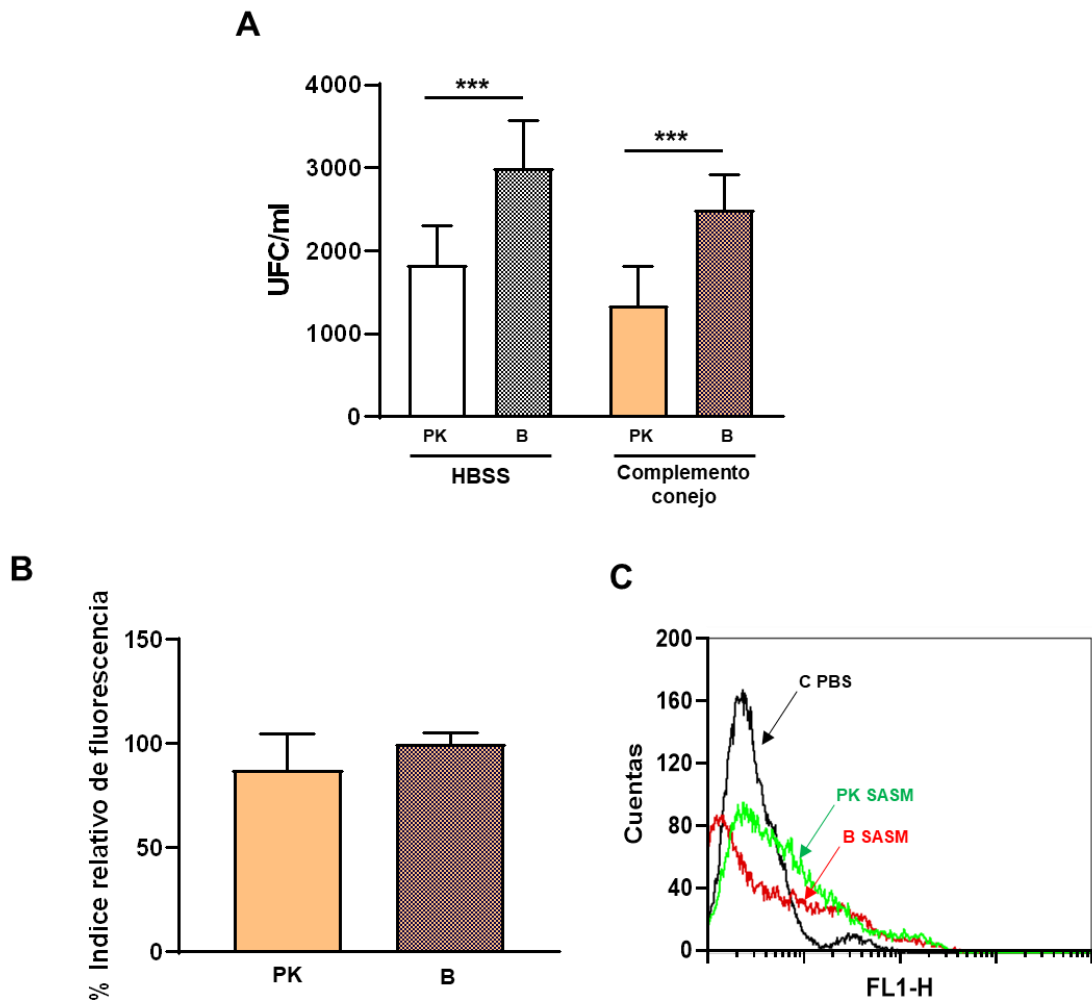
Otro aspecto importante de estudio en esta Tesis con el patógeno *S. aureus* consistió en caracterizar el papel del receptor de neutrófilos PSGL-1 en la fagocitosis de *S. aureus* y en determinar la capacidad de los biofilms de *S. aureus* para evadir el sistema inmune. Con relación al primer aspecto, se utilizó la línea celular HL-60 diferenciada a granulocitos que expresaban o no, el receptor PSGL-1 mediante tratamiento farmacológico con el anticuerpo KPL-1 (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Se probaron diferentes aislados de SASM y de SARM de distintos serotipos capsulares en estado planctónico sin observar diferencias en ninguno de los aislados clínicos independientemente de que el receptor PSGL-1 estuviera activo o no (**Figura 44**). Estos resultados confirman que este receptor no participa en la fagocitosis de *S. aureus*, a diferencia de lo descrito para otro patógeno importante como *S. pneumoniae* (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016).



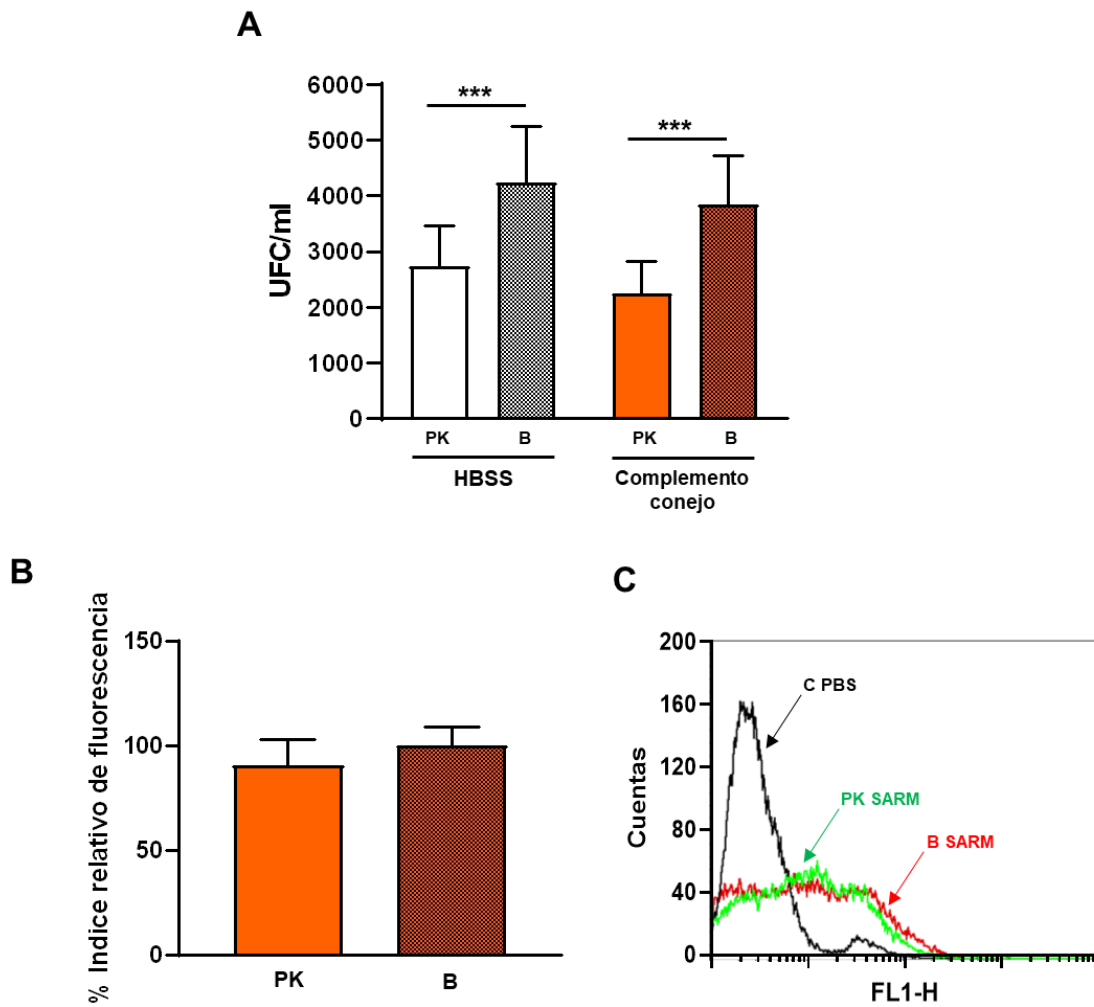
**Figura 44.** Importancia del receptor PSGL-1 en la fagocitosis de *S. aureus* en estado planctónico. Se utilizaron aislados de cepas SASM y SARM con diferentes cápsulas (60031/19, *cap5*; 60642/17, *cap5*; 60574/17, *cap8*; 60061/19, *cap5*; 60615/14, *cap5*; 62822/15, *cap8*). Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos tenían el receptor bloqueado (KPL1) o no (control isotipo IgG1).

Una de las principales características de los biofilms bacterianos es que son capaces de evadir los sistemas de defensa inmune del hospedador. En *S. aureus*, se han descrito diversos mecanismos para evadir el sistema inmune (Vuong *et al.*, 2004, Thurlow *et al.*, 2011, Bhattacharya *et al.*, 2018). Pero ningún trabajo ha dilucidado un mecanismo de evasión del sistema inmune del biofilm por evasión del depósito de C3b como en *S. epidermidis* o *S. pneumoniae* o en la opsonofagocitosis comparado con el cultivo planctónico. Por ello, el segundo aspecto que se analizó en este apartado, consistió en estudiar la capacidad del biofilm de *S. aureus* para evadir el sistema inmune. Se utilizaron dos aislados clínicos control 60031/19 (SASM) y 60061/19 (SARM) que no expresasen ningún factor de virulencia. Los aislados fueron incubados en paralelo utilizando agitación para estudiar el cultivo planctónico o en una placa multipocillo de poliestireno para estudiar la evasión del biofilm *in vitro*.

Los experimentos de fagocitosis para comparar la evasión del cultivo planctónico y del biofilm se realizaron en presencia, o no, de complemento de conejo (**Figuras 45A y 46A**), observándose que, en ambas situaciones, el biofilm de las cepas SASM y SARM evadían mejor la fagocitosis por neutrófilos, por un mecanismo independiente de la presencia de complemento. Para confirmar este hallazgo se analizó el depósito del componente C3 en los cultivos planctónicos y los biofilms (**Figuras 45B-C y 46B-C**). Los resultados confirmaron que el depósito del componente C3 del complemento fue similar en el cultivo planctónico y en el biofilm, tanto en la cepa SASM como en la cepa SARM (**Figuras 45B-C y 46B-C**). Estos resultados sugieren que en *S. aureus* la formación de biofilm le permite evadir el sistema inmune pero, a diferencia de neumococo, es independiente de la inmunidad mediada por el sistema del complemento.



**Figura 45.** Comparación de la evasión de la fagocitosis del cultivo planctónico vs. biofilm del aislado SASM 60031/19. (A) Viabilidad después de la fagocitosis del cultivo planctónico y biofilm en presencia o no de complemento de conejo. (B) Depósito del componente C3 del complemento en cultivo planctónico y biofilm expuestos previamente a suero. (C) Histograma de citometría del análisis del depósito del componente C3 del complemento en cultivo planctónico (PK) o biofilm (B).



**Figura 46.** Comparación de la evasión de la fagocitosis del cultivo planctónico vs. biofilm del aislado SARM 60061/19. (A) Viabilidad después de la fagocitosis del cultivo planctónico y biofilm en presencia o no de complemento de conejo. (B) Depósito del componente C3 del complemento en cultivo planctónico y biofilm expuestos previamente a suero. (C) Histograma de citometría del análisis del depósito del componente C3 del complemento en cultivo planctónico (PK) o biofilm (B).

#### 4. BIOFILMS MIXTOS DE *S. AUREUS* Y *S. PNEUMONIAE*

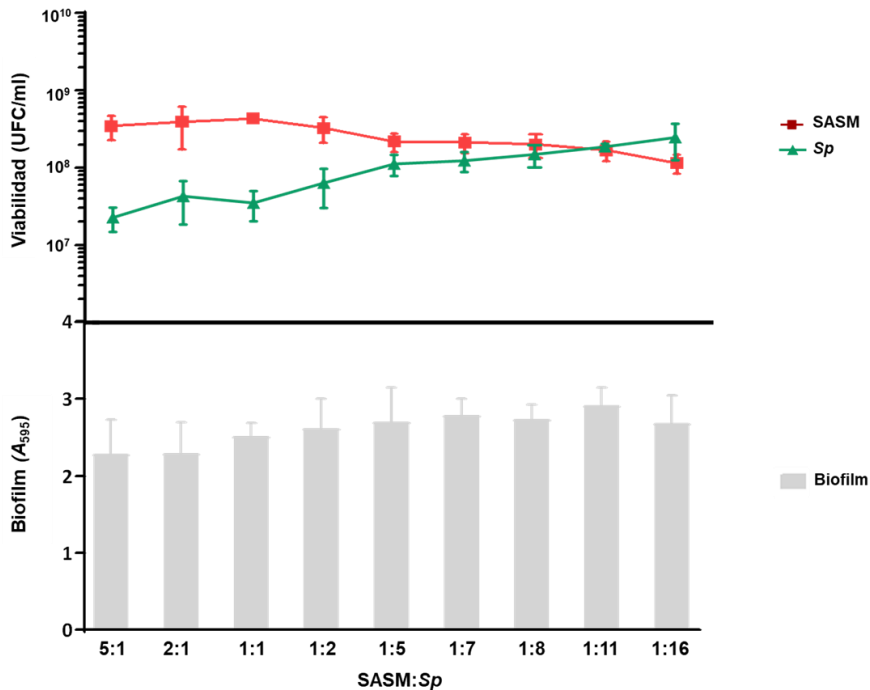
Antes de la introducción de las vacunas conjugadas y después de la introducción de la VCN7, diferentes estudios mostraron una asociación negativa entre los patógenos *S. pneumoniae* y *S. aureus* en la colonización de la nasofaringe, llegando algunos trabajos a describir que la portación de serotipos vacunales por la VCN7 impedía la colonización por *S. aureus* (Regev-Yochay *et al.*, 2004, Spijkerman *et al.*, 2012, Chien *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2013). En contraste a estos trabajos, en modelos de cocolonización con ambas bacterias patógenas tanto sobre células como en modelos animales, esta asociación negativa no parecía tener lugar (Reddinger *et al.*, 2018, Park *et al.*, 2008, Margolis, 2009). Además, varios estudios epidemiológicos habían mostrado que hasta un 24% de los pacientes estaban colonizados por ambas especies (Quintero *et al.*, 2011, Ebruke *et al.*, 2016, Melles *et al.*, 2007) y que las vacunas conjugadas no modificaban la colonización nasofaríngea por *S. aureus* (Cohen *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009).

Debido a estas discrepancias en la literatura, se propuso investigar en esta Tesis la interacción entre *S. aureus* y *S. pneumoniae* y desarrollar para ello un modelo de biofilm mixto *in vitro*. Además, se ensayaron posibles terapias para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estado de biofilm, que puedan afectar a ambos patógenos.

##### 4.1. Desarrollo de un biofilm mixto de *S. aureus* y *S. pneumoniae*

Para poner a punto el biofilm mixto se usó una cepa de *S. pneumoniae* serotipo 19A (YNM4), ya que se trata de uno de los serotipos que mejor forman biofilm y es de los más prevalentes en colonización, con una incidencia significativa en ENI a pesar de encontrarse incluido en la VCN13 (Laufer *et al.*, 2010, Domenech *et al.*, 2014, Ladhani *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020, Ouldali *et al.*, 2021). Esta cepa es un mutante isogénico construido en esta Memoria de Tesis con fondo genético conocido, para evitar efectos asociados a otras diferencias genéticas mediante el uso de aislados clínicos diversos. Respecto a *S. aureus*, se emplearon dos aislados clínicos, un SASM (60031/19) y un SARM (60061/19), que permitieron analizar el posible impacto de la variación de susceptibilidad a meticilina y ver si, por una parte, el patrón de resistencia a meticilina afectaba o no a la interacción con neumococo en el biofilm

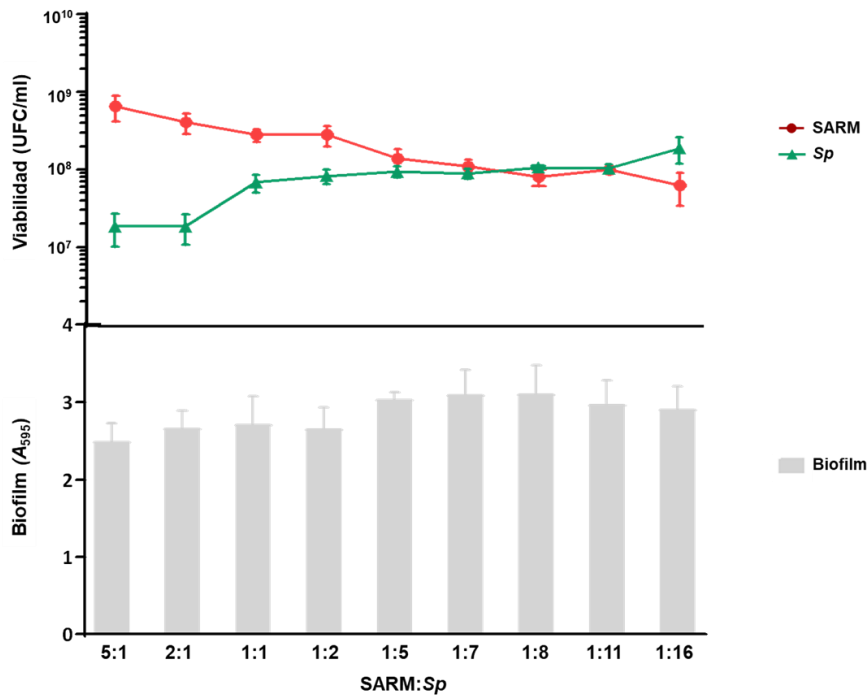
mixto y a la actividad antimicrobiana de diferentes terapias. Sobre la base de lo anterior, se desarrollaron dos sistemas de biofilm mixto *in vitro*, incluyendo un sistema SASM–*Sp* y un sistema SARM–*Sp*.



**Figura 47.** Influencia de las proporciones en el inóculo de SASM y *S. pneumoniae* para la formación de biofilms mixtos *in vitro*. *S. aureus* y *S. pneumoniae* se combinaron en diferentes proporciones y se usaron alícuotas con 200  $\mu$ l de volumen final que contenían de  $8 \times 10^5$  a  $8 \times 10^6$  UFC/ml que se dispensaron en una placa multipocillo de poliestireno y se incubaron durante 5 h a 34 °C. La viabilidad de SASM (cuadrados rojos) y *S. pneumoniae* (triángulos verdes) se determinó mediante recuento de viables. Las barras grises indican formación de biofilm mixto determinada por tinción con CV.

Lo primero que se hizo fue caracterizar las diferentes proporciones de inóculo de ambos patógenos para establecer las condiciones óptimas para la supervivencia de ambas especies en el biofilm mixto (**Figuras 47 y 48**). Se incubaron todos los biofilms

durante 5 h a 34 °C y se determinó la biomasa del biofilm por tinción con CV y densidad óptica ( $A_{595}$ ) analizando la proporción de ambas especies dentro del biofilm mediante recuento de viables (**Figuras 47 y 48**).



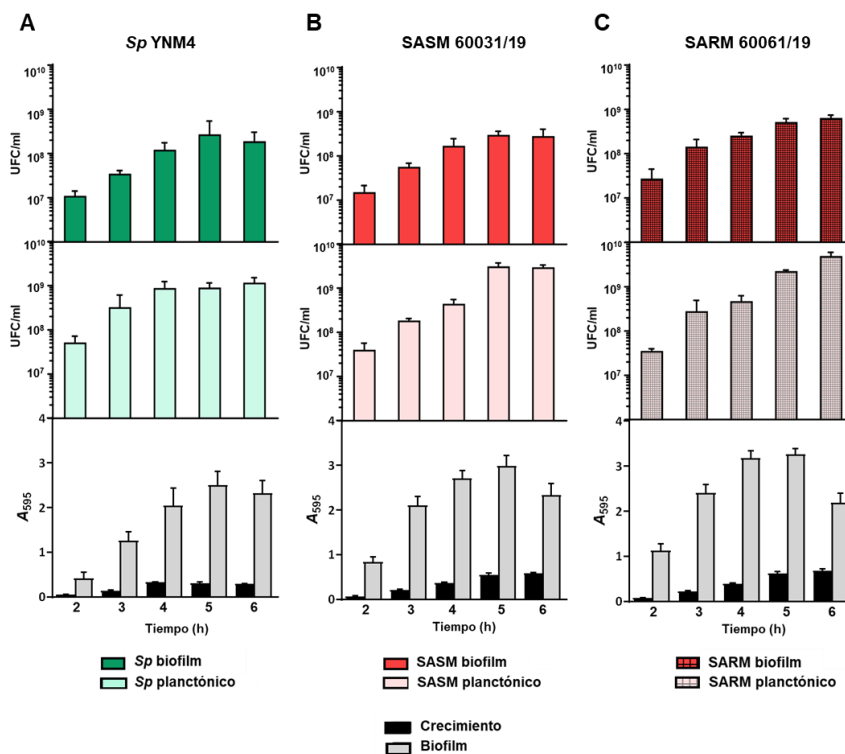
**Figura 48.** Influencia de las proporciones en el inóculo de SARM y *S. pneumoniae* para la formación de biofilms mixtos *in vitro*. *S. aureus* y *S. pneumoniae* se mezclaron en diferentes proporciones y se usaron alícuotas con 200  $\mu$ l de volumen final que contenían de  $8 \times 10^5$  a  $8 \times 10^6$  UFC/ml que se dispensaron en una placa multipocillo de poliestireno y se incubaron durante 5 h a 34 °C. La viabilidad de SARM (círculos rojos) y *S. pneumoniae* (triángulos verdes) se determinó mediante recuento de viables. Las barras grises indican formación de biofilm mixto determinada por tinción con CV.

En ambos sistemas se observó que, para obtener unos niveles similares de ambas especies en el biofilm mixto a tiempo final, el número de células de *S. pneumoniae* en el inóculo tenía que ser mayor que el de *S. aureus* (**Figuras 47 y 48**). Esto ocurría tanto en el biofilm mixto con la cepa SASM como con la cepa SARM, por lo que era

independiente del perfil de susceptibilidad a metilina. Las proporciones del inóculo de *S. aureus*–*S. pneumoniae* más adecuadas para obtener la misma proporción en el biofilm mixto a tiempo final fueron de 1:11 en el caso del sistema SASM:*Sp* y entre 1:7 y 1:11, en el del sistema SARM:*Sp*. Además, se observó un aumento en la biomasa del biofilm ( $A_{595}$ ) en ambos sistemas cuando la cantidad de neumococos en el inóculo era mayor (proporciones 1:2, 1:5, 1:7, 1:8, 1:11 y 1:16). Estas diferencias comparadas con la biomasa del biofilm cuando *S. aureus* predominaba en el inóculo (proporciones 5:1 y 2:1) en ambos sistemas fueron significativas (\*\* $P < 0.001$ , ANOVA unidireccional) (**Figuras 47 y 48**).

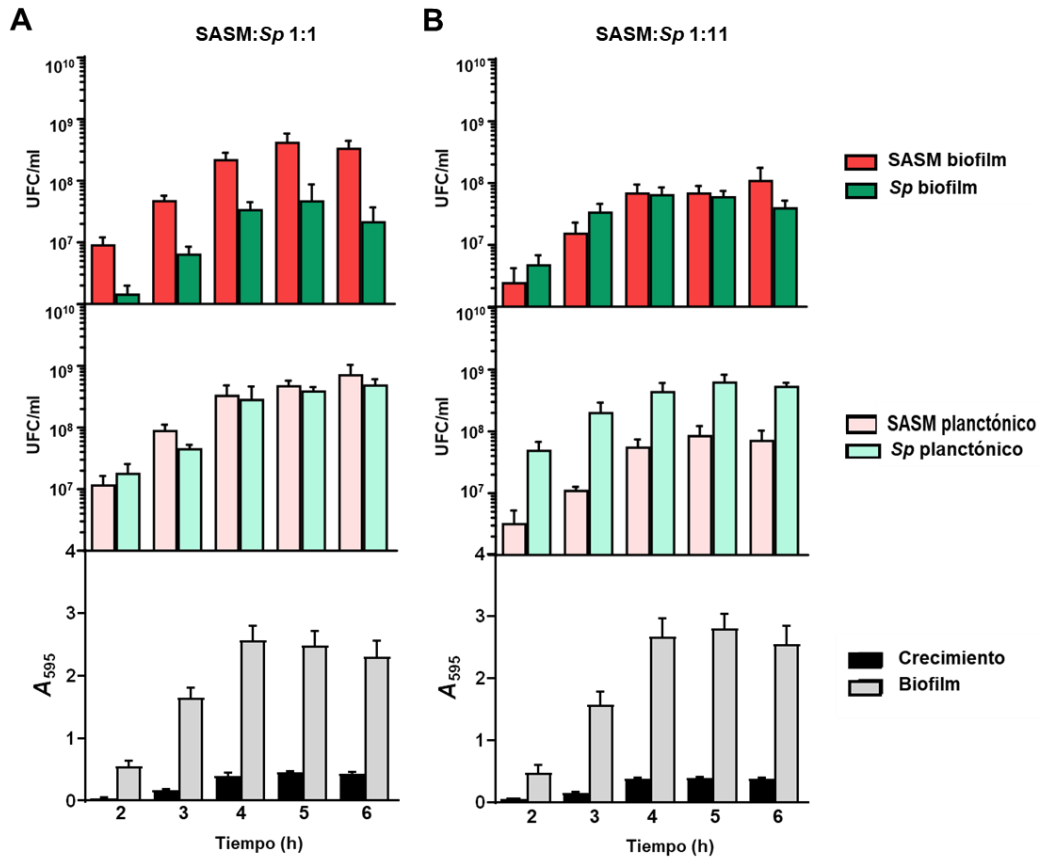
Para los siguientes experimentos, se eligieron las proporciones 1:1 y 1:11 para ambos sistemas de biofilm mixto (SASM:*Sp* y SARM:*Sp*) y el periodo de incubación total de 5 h. El motivo de utilizar este periodo de tiempo relativamente corto se justifica en la observación de que los biofilms individuales de ambas especies mostraban una reducción en biomasa tras 5-6 h de incubación (**Figura 49**), fenómeno que ya se ha descrito previamente en los biofilms *in vitro* de neumococo (Domenech y García, 2016). La proporción 1:1 del inóculo permite realizar ensayos de inhibición del biofilm mixto, ya que, al inicio de este, ambas poblaciones serán iguales, condición ideal para ensayar posibles terapias preventivas. Por otro lado, se seleccionó la proporción 1:11 para estudiar los efectos terapéuticos de los diferentes compuestos a probar en biofilms mixtos formados, en el que la población de ambos patógenos era muy similar a las 4-5 h (**Figuras 47, 48, 50 y 51**).

Una vez establecidas las condiciones óptimas, se analizó la evolución de los biofilms individuales de las tres cepas utilizadas en los biofilms mixtos (**Figura 49**). También se estudió la evolución de los dos sistemas de biofilm mixto *in vitro* utilizando las proporciones 1:1 y 1:11 (**Figuras 50 y 51**). Como era de esperar en *S. pneumoniae*, el tiempo de incubación del biofilm *in vitro* en el que se alcanza el máximo de bacterias viables (UFC/ml) y de biomasa ( $A_{595}$ ) fue 5 h (**Figura 49A**). A partir de las 5 h, se observa una disminución tanto de la viabilidad como de la biomasa en el biofilm neumocócico. En el caso de las cepas SASM y SARM, el biofilm a 5-6 h alcanza el máximo de viabilidad (en el periodo estudiado), pero a las 6 h se observó un fenómeno de disminución de biomasa en el biofilm al cuantificar con CV (**Figura 49B-C**). Por todo ello, las condiciones de biofilm mixto *in vitro* de 5 h fueron las escogidas, como se comentó previamente.

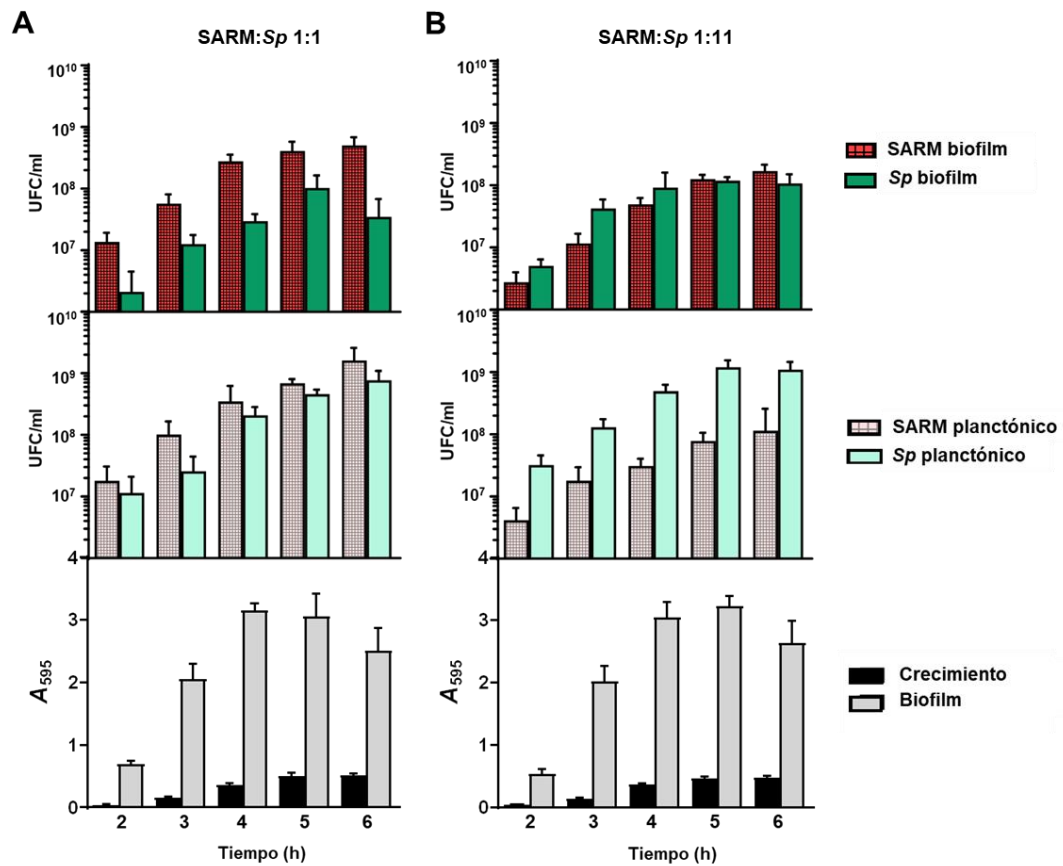


**Figura 49.** Evolución de los biofilms individuales de las cepas *S. pneumoniae* 19A, SASM, y SARM. **(A)** Biofilm de la cepa *S. pneumoniae* YNM4 (S19A). El panel superior muestra las células viables del biofilm de *S. pneumoniae* (verde). El panel intermedio muestra las células viables del cultivo planctónico de *S. pneumoniae* (verde claro). En el panel inferior se representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. **(B)** Biofilm de la cepa *S. aureus* 60031/19 (SASM). El panel superior muestra las células viables del biofilm de *S. aureus* (rojo). En el panel intermedio se incluyen las células viables del cultivo planctónico de *S. aureus* (rojo claro). En el panel inferior se representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. **(C)** Biofilm de la cepa *S. aureus* 60061/19 (SARM). En el panel superior se representan las células viables del biofilm de *S. aureus* (rojo con patrón). El panel intermedio muestra las células viables del cultivo planctónico de *S. aureus* (rojo con patrón claro). En el panel inferior se representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. Los datos representan una media de seis experimentos. Las barras representan la desviación estándar.

Respecto a la evolución de los sistemas SASM:Sp (**Figura 50**) y SARM:Sp (**Figura 51**) se observa un crecimiento similar al observado en los biofilms individuales (**Figura 49**). En ambos sistemas, cuando se utiliza en proporción 1:1, en la que las cantidades de *S. aureus* y *S. pneumoniae* son iguales en el inóculo, se puede observar un claro predominio de *S. aureus* en el biofilm mixto a tiempo final (**Figuras 50A y 51A**) en comparación con *S. pneumoniae*. Este predominio del número de viables del biofilm no ocurre cuando se analiza el número de viables de bacterias en forma planctónica del biofilm, donde ambas poblaciones bacterianas son similares (**Figuras 50A y 51A**). Por el contrario, en la proporción 1:11, se alcanza un número de viables en el biofilm similar en ambas poblaciones bacterianas a las 4-5 h, como ya se observó previamente (**Figuras 47 y 48**). Además, estos resultados muestran que *S. pneumoniae* requiere también un predominio en el número de bacterias viables del cultivo planctónico del biofilm respecto a *S. aureus* para poder mantener esa población similar en el biofilm mixto (**Figuras 50B y 51B**). Un hallazgo interesante es que *S. aureus* puede mantener una población mayor en el biofilm mixto con una proporción similar en el cultivo planctónico (**Figuras 50A y 51B**). Generalmente, se observa que a partir de las 5 h la viabilidad de neumococo en el biofilm mixto disminuye (**Figuras 50 y 51**).



**Figura 50.** Evolución del biofilm mixto SASM–*S. pneumoniae* usando dos proporciones. **(A)** Biofilm mixto SASM–*Sp* (1:1). En el panel superior se representan las células viables del biofilm mixto de SASM (rojo) y *S. pneumoniae* (verde). En el panel intermedio se muestran las células viables del cultivo planctónico de SASM (rojo claro) y *S. pneumoniae* (verde claro). En el panel inferior se representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. **(B)** Biofilm mixto SASM–*Sp* (1:11). El panel superior muestra las células viables del biofilm mixto de SASM (rojo) y *S. pneumoniae* (verde). En el panel intermedio se encuentran las células viables del cultivo planctónico de SASM (rojo claro) y *S. pneumoniae* (verde claro). En el panel inferior se representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. Los datos representan una media de seis experimentos. Las barras representan la desviación estándar.



**Figura 51.** Evolución del biofilm mixto SARM–*S. pneumoniae* usando dos proporciones. **(A)** Biofilm mixto SARM–*Sp* (1:1). El panel superior muestra las células viables del biofilm mixto de SARM (rojo con patrón) y *S. pneumoniae* (verde). En el panel intermedio se indican las células viables del cultivo planctónico de SARM (rojo con patrón claro) y *S. pneumoniae* (verde claro). El panel inferior representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. **(B)** Biofilm mixto SARM–*Sp* (1:11). El panel superior muestra las células viables del biofilm mixto de SARM (rojo con patrón) y *S. pneumoniae* (verde). En el panel intermedio se indican las células viables del cultivo planctónico de SARM (rojo con patrón claro) y *S. pneumoniae* (verde claro). El panel inferior representa el crecimiento total (barras negras) y el biofilm (barras grises) determinados por tinción con CV. Los datos representan una media de seis experimentos. Las barras representan la desviación estándar.

## 4.2. Terapias frente a biofilms mixtos de *S. aureus* y *S. pneumoniae*

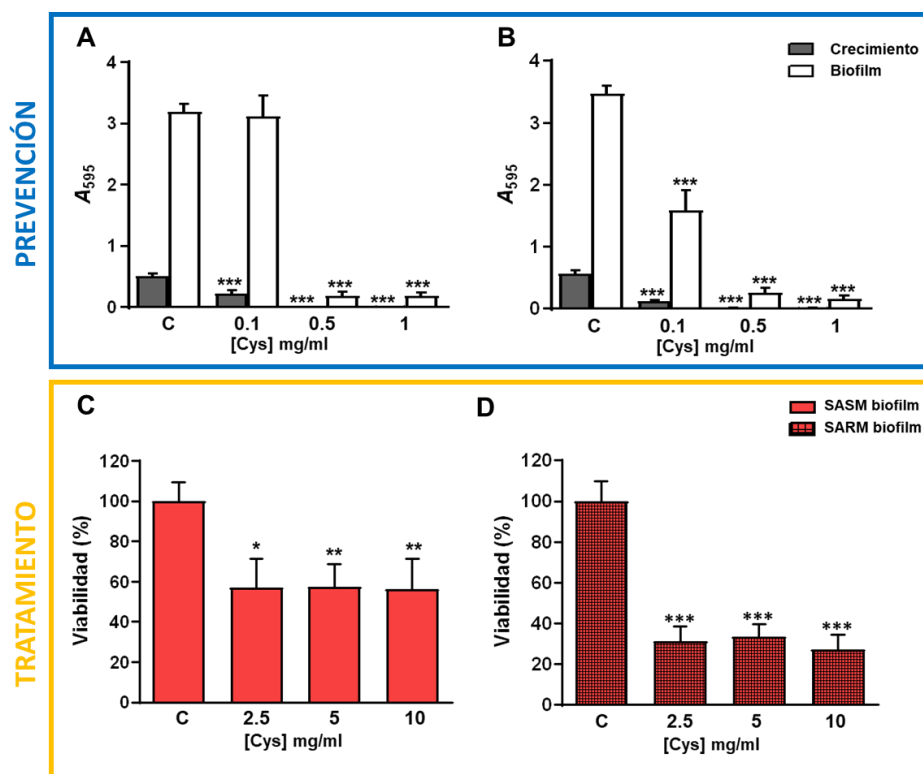
### 4.2.1. Los efectos bactericidas de NAC y Cys en los biofilms mixtos SASM–Sp y SARM–Sp

Dos de los primeros candidatos como terapia antibiofilm frente a biofilms mixtos *S. aureus*–*S. pneumoniae* que se analizaron fueron los antioxidantes *N*-acetil-L-cisteína (NAC) y cisteamina (Cys). Ya previamente se había probado la NAC frente a biofilms individuales de *S. aureus* (Manoharan *et al.*, 2020) y de *S. pneumoniae* (Domenech *et al.*, 2012) y el efecto de Cys en biofilms individuales de *S. pneumoniae* (Domenech y García, 2017), siendo estos compuestos efectivos. Sin embargo, no había datos previos del efecto de Cys en la prevención y tratamiento de biofilms individuales de *S. aureus* por lo que, en esta Tesis Doctoral, se estudió su efecto tanto en el biofilm individual de *S. aureus* como frente a los biofilms mixtos.

Lo primero que se realizó fueron los ensayos de inhibición (prevención) sobre los biofilms individuales tanto del aislado clínico SASM como del SARM (**Figura 52A-B**). En este modelo de prevención, se observó un efecto antimicrobiano significativo de Cys cuando se aplicaron dosis por encima de la CMI, mostrando una reducción drástica tanto en el crecimiento total como en el biofilm, independientemente del perfil de susceptibilidad a meticilina (tanto en el biofilm de la cepa SASM como en el de la cepa SARM) (**Figura 52A-B**). Este efecto fue significativo en ambos sistemas al realizar una comparación múltiple ( $***P < 0.001$ , ANOVA unidireccional). Además, en el caso de la cepa SARM, cuando se expuso el biofilm a concentraciones subinhibitorias de Cys (0.1 mg/ml) se observó más efecto tanto en el crecimiento como en el biofilm, en comparación con la cepa SASM (**Figura 52B**), donde sólo se pudo observar una reducción en el crecimiento, pero no en el biofilm (**Figura 52A**).

El tratamiento de los biofilms de ambas cepas de *S. aureus* con Cys mostró actividad antimicrobiana a partir de concentraciones superiores a 2.5 mg/ml ( $***P < 0.001$ , ANOVA unidireccional) (**Figura 52C-D**). Se probaron concentraciones inferiores a esta cantidad, pero no mostraron ningún efecto en el biofilm ya formado (datos no mostrados). Esta reducción de la viabilidad con  $\geq 2.5$  mg/ml de Cys fue mayor en el biofilm de la cepa SARM que en el de la cepa SASM (**Figura 52C-D**). Sin embargo,

no aumentó la actividad antimicrobiana del antioxidante con concentraciones crecientes de este, obteniéndose los mismos niveles de reducción de viabilidad con dosis hasta 20 mg/ml (datos no mostrados). El tratamiento con Cys mostró una efectividad limitada frente a biofilms de *S. aureus*, mostrando una reducción de hasta un 45% para el biofilm de la cepa SASM (**Figura 52C**) y hasta un 65%, para el biofilm de la cepa SARM (**Figura 52D**).



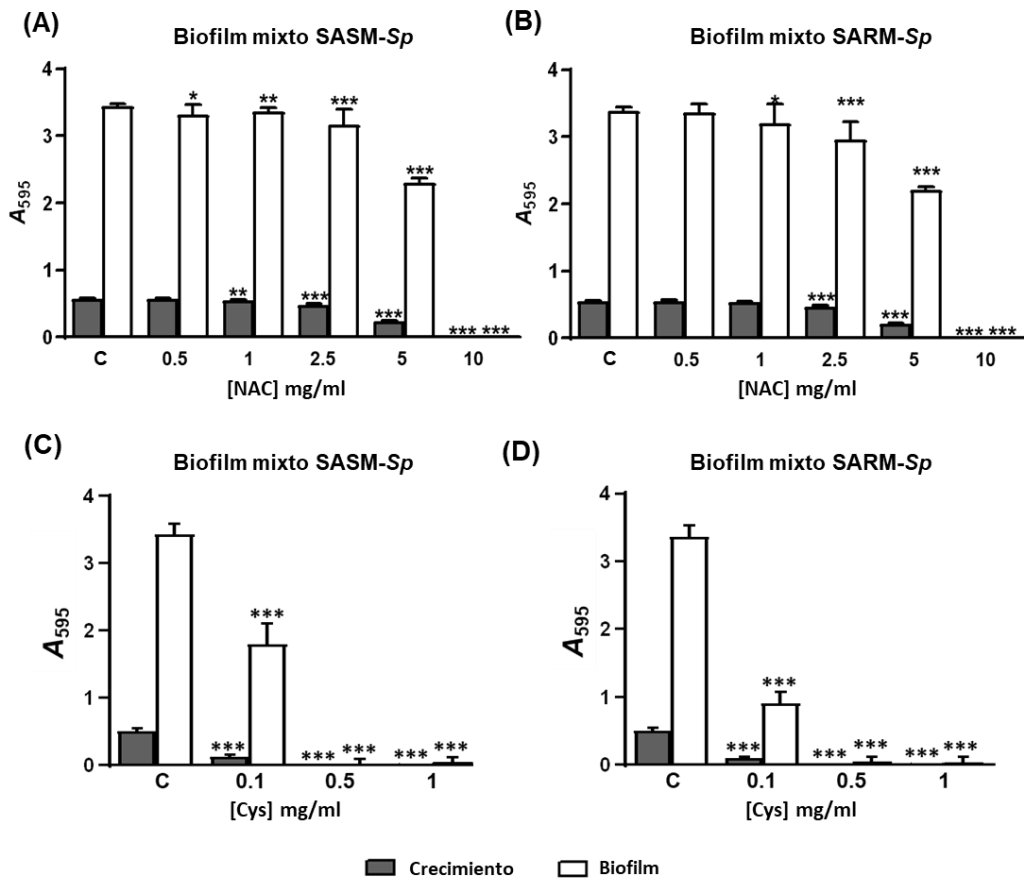
**Figura 52.** Prevención y tratamiento de biofilms monoespecíficos de *S. aureus* con Cys. (**A** y **B**) Diferentes concentraciones de Cys se añadieron al inicio con el inóculo y se incubaron durante 5 h a 37 °C. Después se realizó la tinción con CV. Las barras grises oscuras representan el crecimiento total y las blancas representan el biofilm. (**C** y **D**) Tras 4 h de incubación, los biofilms de *S. aureus* fueron lavados con agua destilada e incubados con diferentes concentraciones de Cys durante 1 h a 37 °C. La viabilidad se determinó mediante recuento de viables. Las barras rojas representan la viabilidad del biofilm SASM (**C**) y las rojas con patrón representan la viabilidad del biofilm SARM (**D**). Los datos corresponden a la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los

resultados estadísticamente significativos ( $t$  de Student de dos colas:  $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.001$ ). Para comparaciones múltiples se realizó un ANOVA unidireccional seguido de un test de Dunnet post hoc obteniendo una significación estadística de  $***P<0.001$  en todos los casos.

Una vez probado el efecto de Cys en biofilms individuales de *S. aureus*, se analizó el efecto de los dos antioxidantes, NAC y Cys, en la prevención de los biofilms mixtos de *S. aureus* y *S. pneumoniae* creciendo en la proporción inicial 1:1 (**Figura 53**). En estos experimentos se demostró que el efecto preventivo de NAC en ambos modelos de biofilms mixtos es mucho menor que el efecto de Cys. El uso de concentraciones subinhibitorias de NAC en el biofilm mixto redujo tanto el crecimiento como la formación de biofilm en ambos sistemas (**Figura 53A-B**), pero no fue hasta alcanzar 2.5 mg/ml de NAC cuando este efecto fue mayor, logrando casi la desaparición total del biofilm a 10 mg/ml de la NAC en ambos sistemas ( $***P<0.001$ , ANOVA unidireccional). Al contrario que NAC, Cys volvió a revelar buenos resultados, como ya se observó en los biofilms mono-específicos de *S. aureus*. El uso de concentraciones subinhibitorias de Cys en el biofilm mixto redujo el crecimiento y la formación de biofilm en ambos sistemas, viéndose un efecto mayor en el sistema SARM-*Sp* a 0.1 mg/ml (**Figura 53D**) que en el SASM-*Sp* a esta misma concentración (**Figura 53C**). Estos resultados confirman hallazgos previos relacionados con el efecto preventivo de biofilms mono-específicos de *S. aureus* (**Figura 52A-B**). Además, al usar concentraciones por encima de la CMI, tanto el crecimiento como el biofilm fueron casi erradicados ( $***P<0.001$ , ANOVA unidireccional) (**Figura 53C-D**). Estos resultados indican que Cys es un candidato idóneo para la prevención de biofilms mixtos de *S. aureus*-*S. pneumoniae*, independientemente de la susceptibilidad de *S. aureus* a la meticilina.

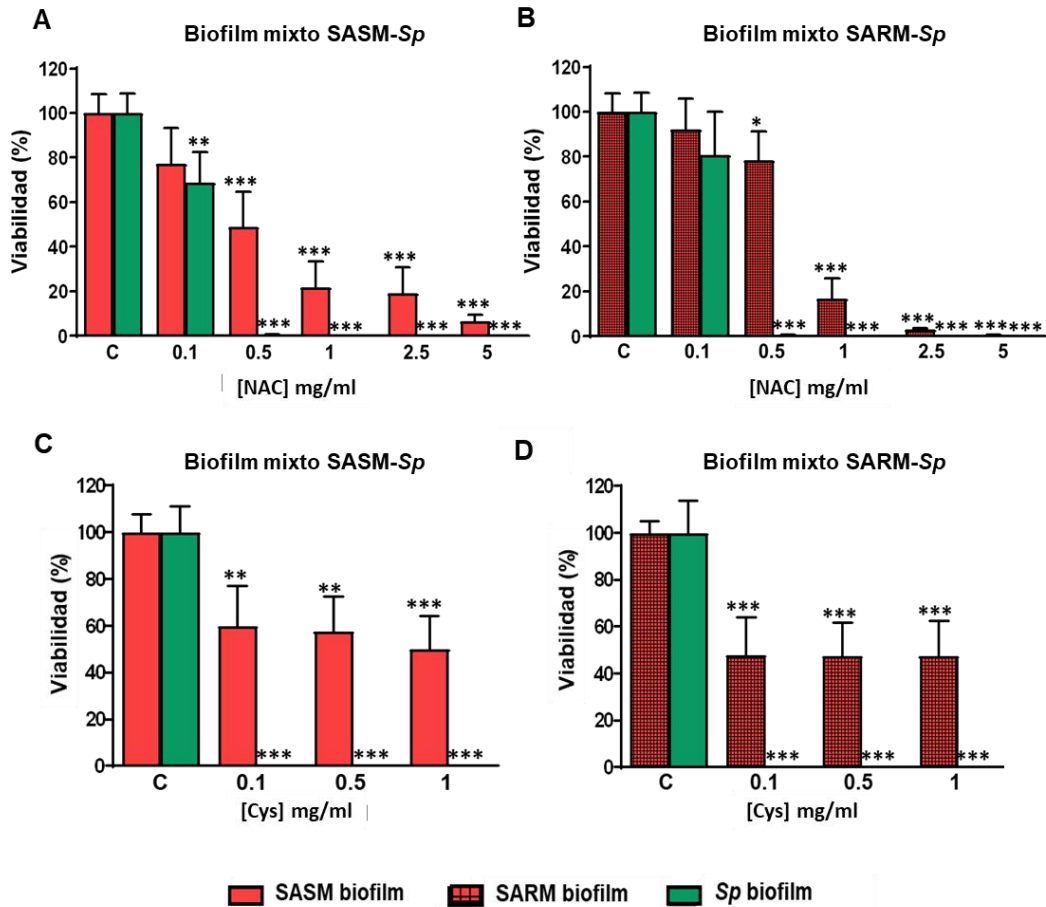
Como se mencionó previamente, los tratamientos se realizaron en la proporción 1:11 en ambos sistemas de biofilm mixto (SASM/SARM: *Sp*, 1:11). El tratamiento con NAC fue efectivo para reducir ambas poblaciones en el biofilm mixto, independientemente del perfil de susceptibilidad ( $***P<0.001$ , ANOVA unidireccional) (**Figura 54A-B**). Los biofilms mixtos expuestos a una concentración muy por debajo de la CMI de 0.5 mg/ml de NAC mostraron una reducción del 50% en la viabilidad de SASM, siendo de más del 20% en la viabilidad de SARM, pero hasta un 99% en la viabilidad de *S. pneumoniae* en ambos sistemas (**Figura 54A-B**). Esta disminución de la viabilidad

de *S. aureus* (tanto SASM y SARM) fue aumentando con concentraciones crecientes hasta llegar a la concentración máxima probada de NAC, de 5 mg/ml, en el que se observó una reducción del 94% en la viabilidad de SASM en el biofilm mixto SASM–*Sp*, una reducción del 99% de la viabilidad de SARM en el biofilm mixto SARM–*Sp* y la casi completa desaparición de *S. pneumoniae* en ambos sistemas de biofilm mixto. Estos resultados indican que la NAC es un candidato prometedor para el tratamiento de los biofilms mixtos *S. aureus*–*S. pneumoniae*.



**Figura 53.** Prevención de la formación de biofilms mixtos de SASM/SARM–*S. pneumoniae* en la proporción 1:1 con los antioxidantes NAC y Cys. Diferentes concentraciones de NAC (A y B) o Cys (C y D) se añadieron al inicio con el inóculo y se incubaron durante 5 h a 37 °C. (A) y (C) Niveles de absorbancia después de la tinción por CV del biofilm mixto SASM–*Sp*. (B) y (D) Niveles de absorbancia después de la tinción por CV del biofilm mixto SARM–*Sp*.

(D) Niveles de absorbancia después de la tinción por CV del biofilm mixto SARM–*Sp*. Las barras grises oscuras representan el crecimiento total y las blancas representan el biofilm. Los datos representan la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001). Para comparaciones múltiples se realizó un ANOVA unidireccional seguido de un test de Dunnet post hoc obteniendo una significancia de \*\*\**P*< 0.001 en todos los casos.



**Figura 54.** Tratamiento de biofilms mixtos de SASM/SARM–*S. pneumoniae* en proporción 1:1 con NAC y Cys. Los biofilms mixtos se incubaron 4 h a 34 °C, seguidos de un lavado con agua destilada e incubación con diferentes concentraciones de NAC (A y B) o Cys (C y D) durante

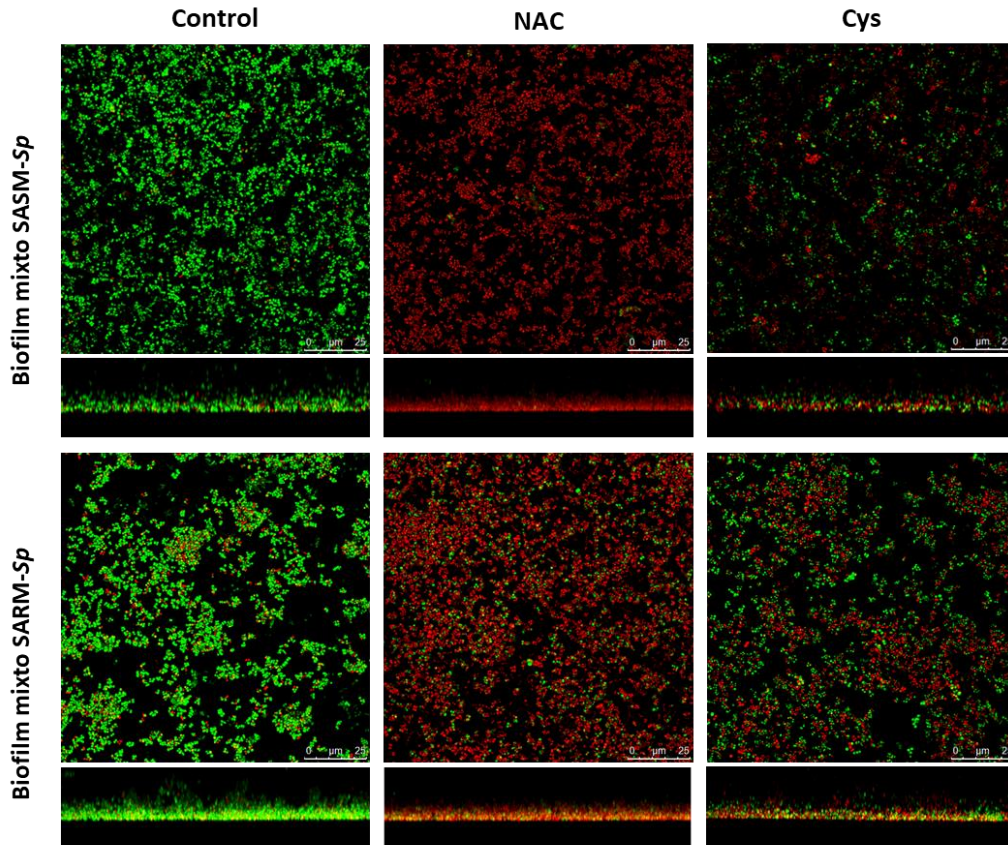
1 h a 37 °C. (A) y (C) Viabilidad del biofilm mixto SASM–*Sp*. (B) y (D) Viabilidad del biofilm mixto SARM–*Sp*. Las barras rojas representan la viabilidad de SASM, las barras verdes representan la viabilidad de *S. pneumoniae* y las barras rojas con patrón representan la viabilidad de SARM. Los datos corresponden a la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Para comparaciones múltiples se realizó un test de ANOVA unidireccional seguido de un test de Dunnet post hoc obteniendo una significancia de \*\*\* $P < 0.001$  en todos los casos.

Al igual que en los biofilms monoespecíficos de *S. aureus*, para el tratamiento con Cys, se ensayaron concentraciones  $\geq 2.5$  mg/ml para comprobar si existía algún efecto en la viabilidad de este compuesto en el biofilm mixto. El tratamiento con Cys mostró una reducción de la población de neumococo en el biofilm mixto del 99% para todas las concentraciones mostradas en ambos sistemas de biofilm mixto (con SASM o SARM) (\*\*\* $P < 0.001$ , ANOVA unidireccional) (Figura 54C-D).

A pesar de esto, Cys no fue tan efectiva respecto a la viabilidad de *S. aureus* dentro del biofilm mixto, obteniéndose niveles similares en reducción de la población de SASM o SARM a la obtenida en los tratamientos de los biofilms monoespecíficos (\*\*\* $P < 0.001$ , ANOVA unidireccional) (Figura 54C-D). La reducción fue de un 40-50% para el SASM que formaba parte del biofilm mixto y de un 50-55% para el SARM en el biofilm mixto (Figura 54C-D), sin obtener ningún aumento usando concentraciones crecientes de Cys hasta 20 mg/ml (datos no mostrados).

Para confirmar el efecto de ambos antioxidantes como tratamiento frente al biofilm mixto se utilizó CLSM. Los biofilms SASM–*Sp* y SARM–*Sp* en proporción 1:11 se incubaron en placas de fondo de vidrio durante 4 h a 34 °C, se lavaron y se trataron con 2.5 mg/ml de NAC o Cys (Figura 55). Las imágenes muestran el efecto de NAC y de Cys en ambos sistemas de biofilm mixto, viendo un efecto mayor de NAC en ambos, en concordancia con los resultados del recuento de viables (Figuras 54 y 55). Se puede observar que la NAC es capaz de destruir activamente las células dentro del biofilm, pero no tiene un efecto significativo en la densidad del mismo, ni tampoco produce su disgregación (Figura 55). Por el contrario, el efecto de 2.5 mg/ml de Cys sí que parece tener un efecto disgregante, pero hay muchas más bacterias

viables en concordancia con lo observado en viables, observándose un efecto mayor en el sistema SASM–*Sp* en este caso, que en el sistema SARM–*Sp* (**Figura 55**).



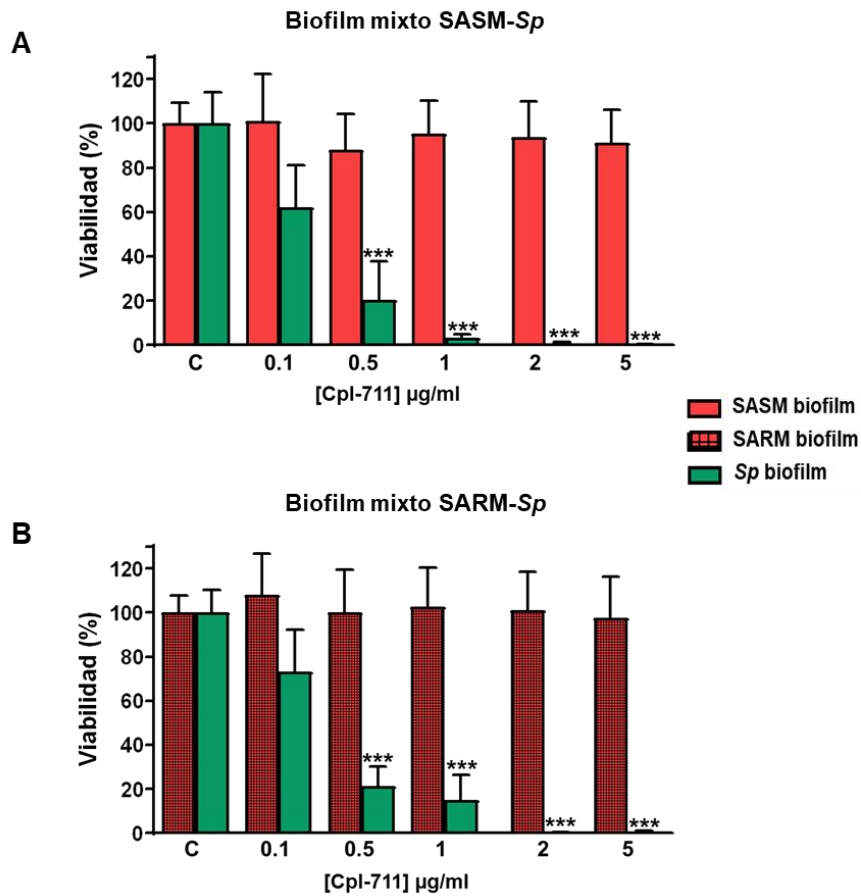
**Figura 55.** Imágenes de CLSM de los biofilms mixtos SASM–*Sp* y SARM–*Sp* en proporción 1:11 tras la exposición a NAC y Cys. Los sistemas de biofilm mixto fueron incubados durante 4 h a 34 °C, lavados con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y tratados (o no) con 2.5 mg/ml de NAC o Cys durante 1 h a 37 °C. Las células dentro del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* que muestra las células viables (fluorescencia verde) y no viables (fluorescencia roja). Proyecciones x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5 µm) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0 µm). Las barras indican un tamaño de 25 µm.

#### 4.2.2. Efecto bactericida de los enzibióticos Cpl-711 y CHAP<sub>k</sub> en los biofilms mixtos SASM–Sp y SARM–Sp

La búsqueda de terapias alternativas a los antibióticos convencionales ha sido una de las prioridades de los últimos años debido al incremento de las resistencias antibióticas. Uno de los tratamientos que surgió para sustituir a los antibióticos convencionales es la terapia fágica y, a principios del presente siglo, las enzimas líticas de fagos y bacterias han sido ampliamente estudiadas como antibacterianos (Vázquez *et al.*, 2018). Dos de estas endolisinas o enzibióticos (Nelson *et al.*, 2001), se probaron en esta Tesis frente a los dos sistemas de biofilms mixtos desarrollados.

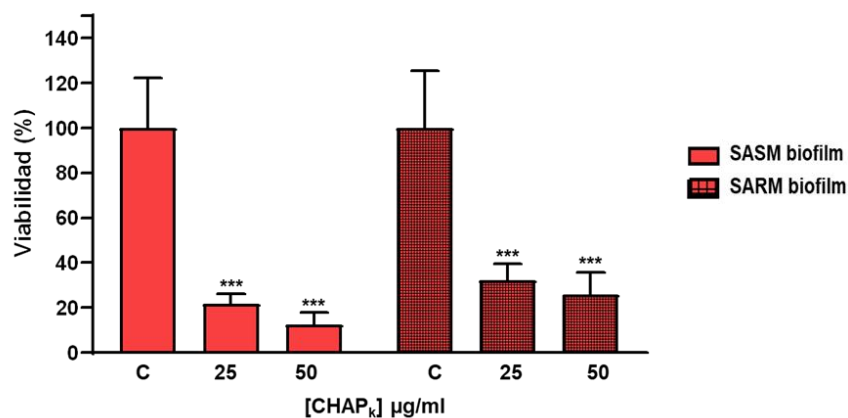
El primer candidato ensayado fue el enzibiótico Cpl-711, una proteína quimérica de las lisozimas Cpl-7 y Cpl-1, siendo una de las candidatas con mayor actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae* (Diez-Martínez *et al.*, 2015), aunque no poseen actividad bactericida frente a *S. aureus* (Díez Martínez, 2014). Si nos fijamos en la **Figura 56**, se observa el efecto esperado de Cpl-711 y con concentraciones pequeñas (de  $\geq 0.1$   $\mu\text{g/ml}$ ). Cpl-711 tiene un efecto sobre la población de *S. pneumoniae* en ambos sistemas de biofilm mixto hasta alcanzar casi la erradicación de la población de neumococo a concentraciones  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  (\*\* $P < 0.001$ , ANOVA unidireccional) (**Figura 56**). Estos resultados indican la gran eficacia de este enzibiótico a la hora de matar *S. pneumoniae*, incluyendo su estado en biofilm y en biofilm mixto con otro patógeno bacteriano. Por otro lado, como cabía esperar, no hubo ningún tipo de efecto de la lisina en la población de *S. aureus* que integra el biofilm mixto, cuya viabilidad no disminuyó a ninguna de las concentraciones probadas, independientemente del perfil de susceptibilidad a metilina (**Figura 56**).

Debido a lo patógeno-específico de las endolisinas, la segunda candidata que se decidió probar fue la lisina fágica truncada CHAP<sub>k</sub> (Fenton *et al.*, 2010). El motivo de usarla es porque previamente había presentado actividad frente a *S. aureus* tanto en estado planctónico como en biofilm (Fenton *et al.*, 2011, Fenton *et al.*, 2013), pero también presentaba cierta actividad frente a la cepa de *S. pneumoniae* probada (Fenton *et al.*, 2011).



**Figura 56.** Tratamiento de biofilms mixtos de SASM/SARM-*Sp* en proporción 1:11 con Cpl-711. Los biofilms mixtos se incubaron 4 h a 34 °C, seguidos de un lavado con agua destilada e incubación con diferentes concentraciones de Cpl-711 durante 1 h a 37 °C. **(A)** Viabilidad del biofilm mixto SASM-*Sp*. **(B)** Viabilidad del biofilm mixto SARM-*Sp*. Las barras rojas representan la viabilidad de SASM, las verdes, la viabilidad de *S. pneumoniae* y las rojas con patrón representan la viabilidad de SARM. Los datos corresponden a la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Para comparaciones múltiples se realizó un test de ANOVA unidireccional seguido de un test de Dunnet post hoc obteniendo una significancia de \*\*\* $P < 0.001$  en el caso de la viabilidad de *S. pneumoniae* en ambos sistemas.

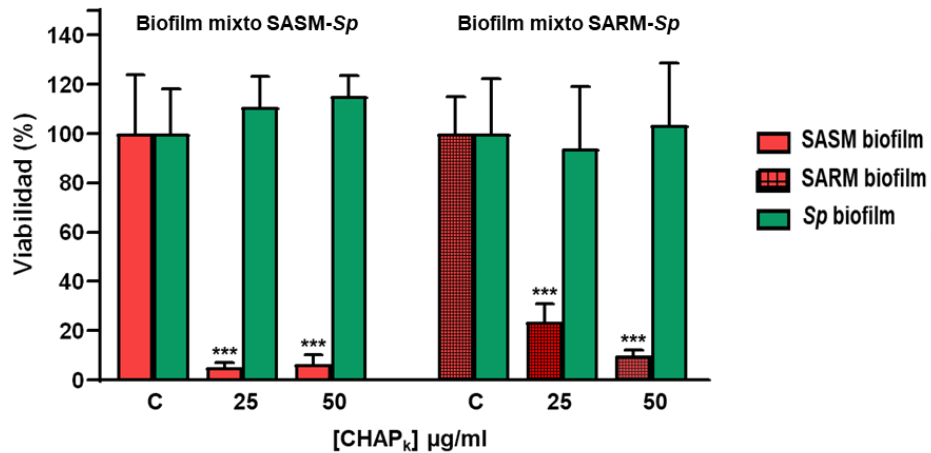
Antes de ensayar el efecto de la CHAP<sub>κ</sub> en el biofilm mixto, el enzibiótico se probó sobre biofilms individuales de *S. aureus* para estudiar su actividad con la metodología que aplicamos (**Figura 57**), ya que en el trabajo previo se emplearon tratamientos de 4 h de duración (Fenton *et al.*, 2013), tiempo de tratamiento imposible para nuestros sistemas de biofilm mixto donde, a partir de 5 h, empezará a verse afectada la viabilidad de *S. pneumoniae* y la biomasa total (**Figuras 4.4 y 4.5**). En las condiciones experimentales utilizadas en esta Memoria, CHAP<sub>κ</sub> no presentó actividad alguna en concentraciones en el rango utilizado normalmente en endolisinas (0-10 µg/ml) (datos no mostrados), por lo que se determinó su CMI frente a los aislados clínicos SASM y SARM utilizados. Se observó que la CMI para ambos aislados clínicos de *S. aureus* fue de 50 µg/ml. Por lo tanto, para los tratamientos, se emplearon tanto una concentración subinhibitoria (la mitad de la CMI) como la CMI (**Figura 57**) y se obtuvo una reducción del 80-85% de la viabilidad de SASM y del 70% de la viabilidad de SARM en los biofilms mono-específicos de *S. aureus* (**Figura 57.**) tras 1 h de incubación a 37 °C.



**Figura 57.** Tratamiento de biofilms mono-específicos de *S. aureus* con CHAP<sub>κ</sub>. Después de 4 h de incubación los biofilms de *S. aureus* fueron lavados e incubados con diferentes concentraciones de CHAP<sub>κ</sub> durante 1 h a 37 °C. La viabilidad se determinó mediante recuento de viables. Las barras rojas representan la viabilidad del biofilm SASM y las barras rojas con patrón representan la viabilidad del biofilm SARM. Los datos corresponden a la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\**P*<0.001).

Para comparaciones múltiples se realizó un test de ANOVA unidireccional seguido de un test de Dunnet post hoc obteniendo una significancia de  $***P < 0.001$  en todos los casos.

Con las mismas condiciones probadas para biofilms monoespecíficos de *S. aureus*, se llevó a cabo el tratamiento de los biofilms mixtos SASM–*Sp* y SARM–*Sp* con  $\text{CHAP}_k$ . En la **Figura 58** se puede observar que la población tanto de SASM como de SARM en el biofilm mixto se vio afectada ( $***P < 0.001$ , ANOVA unidireccional). Incluso en el biofilm mixto se obtiene una disminución superior a la observada en los biofilms monoespecíficos usando 50  $\mu\text{g/ml}$  en ambos casos, disminuyendo más del 90% la población de SASM y casi el 90% la de SARM (**Figura 58**). A pesar de los resultados previos (Fenton *et al.*, 2011), bajo las condiciones estudiadas en esta Memoria no se vio afectada en ningún momento la viabilidad de *S. pneumoniae* en los biofilms mixtos (**Figura 58**).



**Figura 58.** Tratamiento de biofilms mixtos SASM–*Sp* y SARM–*Sp* en proporción 1:11 con  $\text{CHAP}_k$ . Después de 4 h de incubación, los biofilms de *S. aureus*–*S. pneumoniae*, fueron lavados con agua destilada e incubados con diferentes concentraciones de  $\text{CHAP}_k$  durante 1 h a 37 °C. La viabilidad se determinó mediante recuento. Las barras rojas representan la viabilidad de SASM, las verdes representan la viabilidad de *S. pneumoniae* y, las rojas con patrón, representan la viabilidad de SARM. Los datos corresponden a la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas:  $***P < 0.001$ ). Para comparaciones múltiples se realizó un test de ANOVA unidireccional seguido de un test de Dunnet post hoc

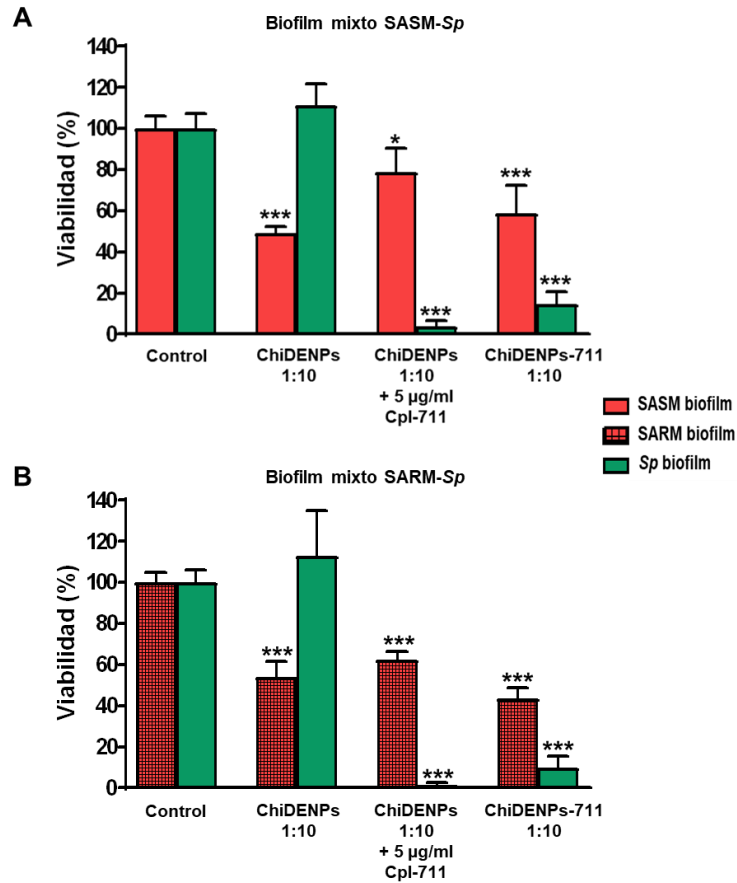
obteniendo una significancia de  $***P < 0.001$  en el caso de la viabilidad de *S. aureus* en ambos sistemas.

#### 4.2.3. Los efectos bactericidas del enzibiótico de tercera generación ChiDENPs-711

Las lisinas fágicas tienen un marcado potencial antimicrobiano aunque una de las principales limitaciones es que su vida media *in vivo* es muy corta, entre 20 y 60 min, y las formulaciones y manera de administrarlas están aún investigándose (De Maesschalck *et al.*, 2020). Una de las aproximaciones a este problema fue la encapsulación y la liberación controlada, que podría mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de estos antimicrobianos. En este sentido, Vázquez y cols. han desarrollado recientemente nanopartículas basadas en quitosano (ChiNPs) que incorporan grupos dietilaminoetil (DEAE) (ChiDENPs) los cuales funcionan como residuos de colina, uniendo estas nanopartículas de forma no covalentemente al enzibiótico previamente usado Cpl-711 (ChiDENPs-711) (Vázquez *et al.*, 2021). Este grupo de investigación del CIB Margaritas Salas nos proporcionó estas nanopartículas para enfrentarlas a los biofilms mixtos desarrollados en esta tesis y comprobar si la nueva formulación tendría efecto también sobre la viabilidad de *S. aureus*, ya que no habíamos observado efecto del enzibiótico Cpl-711 sobre este microorganismo (**Figura 56**).

En la **Figura 59** se puede observar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas basadas en quitosano-DEAE sin cargar (ChiDENPs en concentración 1:10, denominadas también nanopartículas “blancas”), las nanopartículas de quitosano sin cargar más la adición exógena de 5 µg/ml de Cpl-711 y las nanopartículas cargadas con Cpl-711 (ChiDENPs-711). Estas tres opciones se probaron para ver si afectaban a la viabilidad de las bacterias que integran tanto el biofilm SASM–*Sp* como el biofilm SARM–*Sp*. Lo primero que se observó es que las ChiDENPs sin cargar mostraban un efecto sobre la viabilidad de *S. aureus* en ambos biofilms mixtos (**Figura 59**). De manera notable, no se observó este efecto de las nanopartículas blancas en la viabilidad de *S. pneumoniae*. Al añadir a estas nanopartículas sin cargar, 5 µg/ml de Cpl-711 exógeno, se observó un efecto similar en la viabilidad de *S. aureus*, el cual se puede atribuir a las nanopartículas blancas (de manera notable, en el biofilm SASM–*Sp* este efecto disminuyó) pero se puede ver casi una completa erradicación de *S. pneumoniae*, debida a la actuación de la Cpl-711 que previamente se mostró efectiva

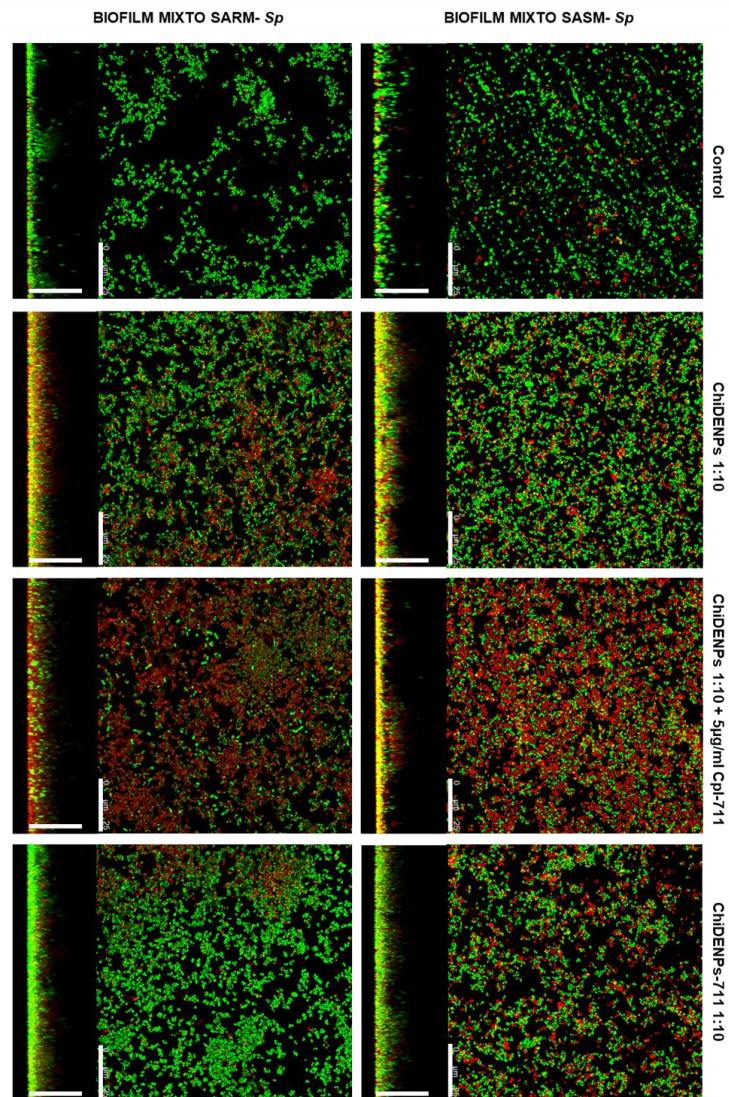
en eliminar la población de este patógeno en el biofilm mixto (**Figuras 56 y 59**). Por último, al añadir las nanopartículas cargadas con Cpl-711, se pudo ver el efecto en la viabilidad de *S. aureus* que ya se observó con las nanopartículas blancas, pero, además se observó un efecto en la viabilidad de *S. pneumoniae* (alrededor del 80% en ambos biofilms SASM–*Sp* y SARM–*Sp*), aunque no tan acentuado como con el tratamiento con la Cpl-711 exógena (**Figura 59**)



**Figura 59.** Tratamiento de biofilms mixtos SASM–*Sp* y SARM–*Sp* en proporción 1:11 con ChiDENPs (cargadas o no). Después de 4 h de incubación, los biofilms mixtos, fueron lavados e incubados con ChiDENPs, ChiDENPS + Cpl-711 o ChiDENPs-711 durante 1 h a 37 °C. La viabilidad se determinó mediante recuento en placa. Las barras rojas representan la viabilidad de SASM, las verdes representan la viabilidad de *S. pneumoniae* y las rojas con patrón repre-

sentan la viabilidad de SARM. Los datos corresponden a la media de, al menos, tres experimentos. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

Además, se completó el estudio visualizando el tratamiento mediante CLSM. Los biofilms SASM–*Sp* y SARM–*Sp* en la proporción 1:11 se incubaron en placas de fondo de vidrio durante 4 h a 34 °C, se lavaron con agua destilada y se trataron con ChiDENPs en proporción 1:10, ChiDENPs en proporción 1:10 + Cpl-711 y ChiDENPs-711 en proporción 1:10 (**Figura 60**). Las imágenes muestran un efecto de las nanopartículas no cargadas en la viabilidad de ambos sistemas de biofilm mixto, en concordancia con los resultados del recuento de viables (**Figuras 59 y 60**). El tratamiento que tuvo mayor efecto en la pérdida de viabilidad de los biofilm mixtos fue la combinación de nanopartículas no cargadas más la Cpl-711 exógena, donde se encuentra una gran parte de la población muerta (**Figura 60**). El tratamiento con nanopartículas cargadas (ChiDENPs-711) afectó muy levemente a la viabilidad de los sistemas, siendo más notable en el sistema SARS–*Sp*, y contrario a lo observado en el ensayo de recuento de viables (**Figuras 59 y 60**). Un fenómeno que se observó en todos los tratamientos es un cambio en la estructura y biomasa del biofilm al añadir las ChiDENPs o ChiDENPs-711 debido, posiblemente, a la capacidad de las ChiDENPs de inhibir las CBPs de neumococo y producir ciertas acumulaciones o agregaciones en el biofilm mixto (**Figura 60**).



**Figura 60.** Imágenes de CLSM de los biofilms mixtos SASM–*Sp* y SARM–*Sp* en proporción 1:11 tras la exposición a ChiDENPs cargadas o no. Los sistemas de biofilm mixto fueron incubados durante 4 h a 34 °C, luego lavados y tratados o no con ChiDENPs cargadas o no durante 1 h at 37 °C. Las células dentro del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* que muestra las células viables (fluorescencia verde) y no viables (fluorescencia roja). Proyecciones x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5 µm) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0 µm). Las barras indican 25 µm.

## 5. EFECTO DEL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO EN BIOFILMS DE *S. AU-REUS* Y BIOFILMS MIXTOS DE *S. AUREUS*–*S. PNEUMONIAE*

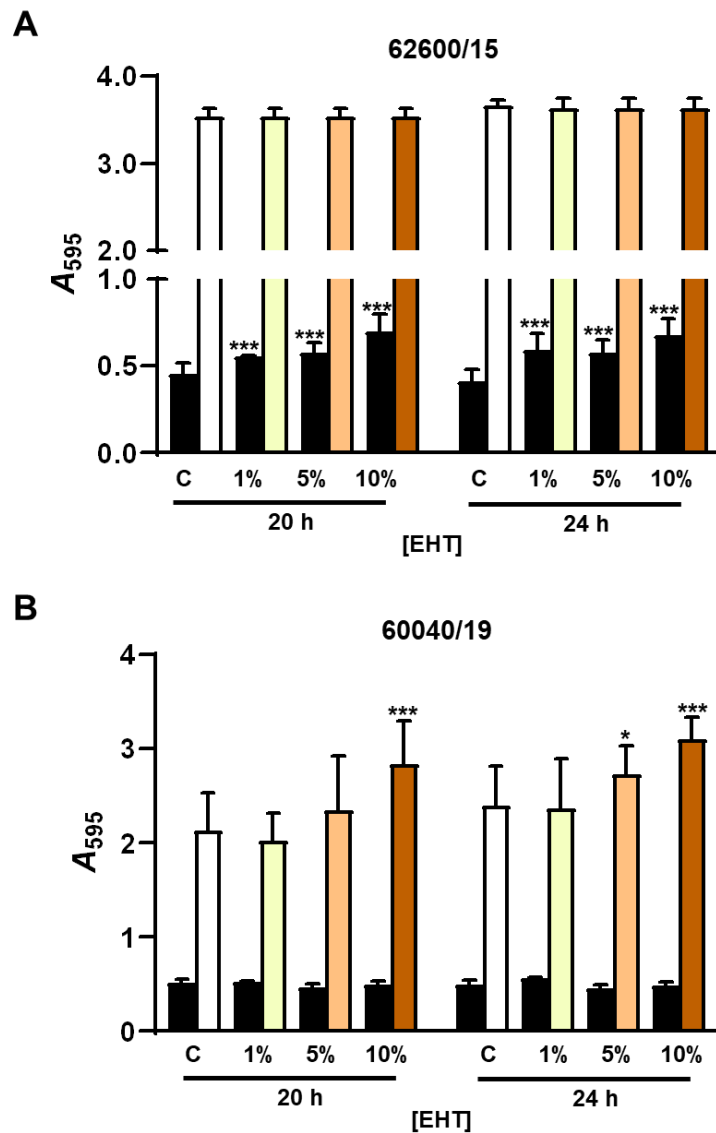
Uno de los mayores problemas sanitarios al que nos enfrentamos en los últimos tiempos es el elevado número de patologías clínicas que se ven afectadas por el consumo de tabaco siendo responsable de unas 8 millones de muertes anuales, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>). Además, el consumo de tabaco está asociado al 90% de los casos de cáncer de pulmón (Proctor, 2012), al 50% de las enfermedades cardíacas (Ambrose and Barua, 2004) y es la principal causa de la EPOC (Zuo *et al.*, 2014). El consumo de tabaco también aumenta el riesgo de infección por diversos patógenos víricos y bacterianos (Nuorti *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2011, Huvenne *et al.*, 2011, Yageta *et al.*, 2011), entre los que se encuentran *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Un aspecto interesante desde la perspectiva microbiológica es que el humo de tabaco (HT) no sólo tiene efecto perjudicial en el propio ser humano, sino que también, al contener componentes químicos bioactivos, puede alterar microorganismos patógenos o comensales que forman parte de la microbiota humana (Kulkarni *et al.*, 2016). Diversos estudios demuestran como el HT aumenta la resistencia al sistema inmune, la formación de biofilm y otros mecanismos de patogenicidad (Mutepe *et al.*, 2013, Kulkarni *et al.*, 2016, Lacoma *et al.*, 2019, Chien *et al.*, 2020).

### 5.1. Efecto del EHT en biofilms de *S. aureus*

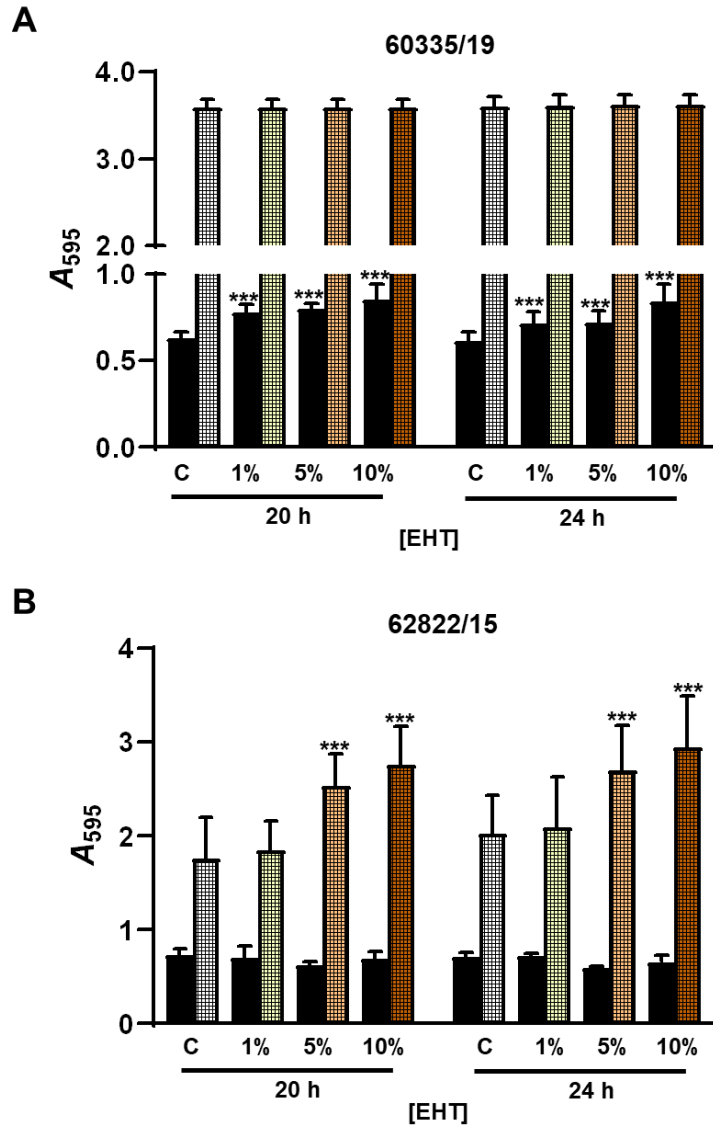
Existen trabajos previos que han analizado el efecto de utilizar extracto de humo de tabaco (EHT) en la virulencia y, específicamente, en el biofilm de cepas SARM (Kulkarni *et al.*, 2012, Lacoma *et al.*, 2019), donde aparecen fenotipos de virulencia alterados con aumento en la formación del biofilm, mayor resistencia a la fagocitosis e incremento en la adhesión e invasión (Kulkarni *et al.*, 2012, McEachern *et al.*, 2015, Kulkarni *et al.*, 2016). Parece ser que el HT redirige el perfil de virulencia de *S. aureus* a un fenotipo de persistencia (Lacoma *et al.*, 2019). Sin embargo, una de las mayores limitaciones de estos trabajos es la elevada cantidad de EHT que se usó, llegándose a probar un 50–100% de EHT para ver su efecto en los biofilms (Kulkarni *et al.*, 2012, Lacoma *et al.*, 2019), forzando así una situación artificial. En estos trabajos previos no se determinó el efecto del EHT ni en la estructura de los biofilms ni en la viabilidad bacteriana. Debido a este vacío de información, se decidió caracterizar el efecto del

EHT en concentraciones más bajas (1–10%) a las estudiadas previamente. Para ello, se analizó su efecto en aislados clínicos SASM y SARM a diferentes tiempos (20 y 24 h), estudiando también su impacto en la biomasa medida con CV ( $A_{595}$ ), en la viabilidad mediante recuento de viables y, a nivel estructural del biofilm, por CLSM.

Se realizaron los ensayos con cuatro aislados clínicos SASM y SARM cuya capacidad de formación de biofilm había sido caracterizada durante un periodo de 28 h y caracterizada su matriz a las 20, 23 y 24 h (Capítulo 3 de esta Memoria). Se analizó así el efecto del EHT en aislados clínicos que formaron siempre buen biofilm (62600/15-SASM y 60335/19-SARM) y en otros que formaron mal biofilm a las 20 y 24 h (60040/19-SASM y 62822/15-SARM). Lo primero que se hizo fue observar el efecto de diferentes concentraciones del EHT en el biofilm mediante tinción con CV (**Figuras 61 y 62**). Se puede observar que en las cepas consideradas como buenas formadoras de biofilm no hay efecto del EHT en el biofilm cuando se utiliza este sistema de cuantificación porque el sistema está saturado al haberse alcanzado su máximo de absorbancia, lo que supone un impedimento para determinar correctamente el efecto del EHT (**Figuras 61A y 62A**). Sin embargo, sí que se observó que, en ambas cepas y a los dos tiempos estudiados, a partir de 1% de EHT, hay un aumento en el crecimiento total (planctónico + biofilm) (**Figuras 61A y 62A**). En el caso de las cepas clínicas consideradas como malas formadoras de biofilm, el EHT produjo un aumento del biofilm en ambos aislados clínicos tanto a 20 h como a 24 h (**Figuras 61B y 62B**). Con un 1% de EHT no parece haber efecto significativo en el biofilm pero, a partir de 5% de EHT, sí que se observa un aumento claro en la formación del biofilm con respecto al control sin EHT. En este caso no se observa efecto en el crecimiento total que sí se observó en las cepas clínicas que eran buenas formadoras de biofilm (**Figuras 61B y 62B**). Una vez analizados los diferentes biofilms con tinción CV, se realizó recuento de viables de los biofilms de los aislados clínicos SARM (60335/19 y 62822/15) expuestos durante 20 y 24 h a diferentes concentraciones de EHT (**Figuras 63 y 64**). Además, se realizó el recuento de viables del cultivo planctónico de esos biofilms. En el aislado clínico SARM considerado como buen formador de biofilm se pudo comprobar que, a pesar de no haber visto un efecto significativo en la capacidad de formación de biofilm en presencia de EHT analizado por CV debido a las limitaciones del sistema (**Figura 62A**), sí que se observó un aumento significativo de hasta un 50% con 10% de EHT en las bacterias viables del biofilm (**Figura 63 A y C**). Esto ocurría tanto a las 20 h como a las 24 h de incubación.

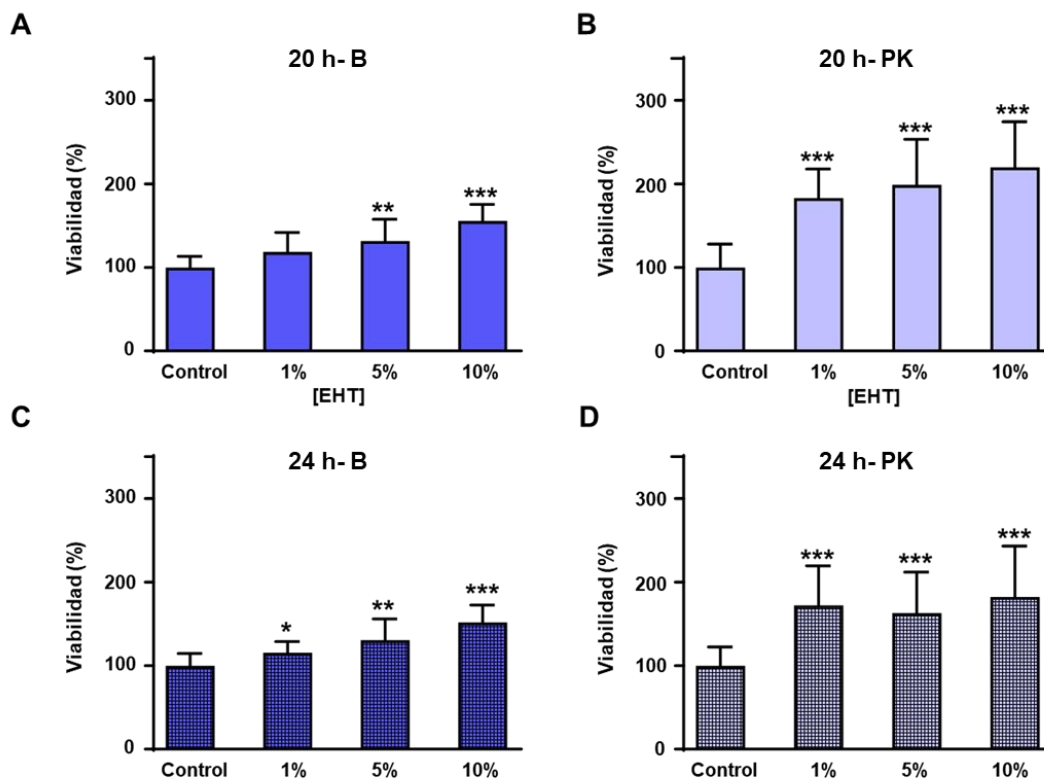


**Figura 61.** Análisis de los efectos del EHT en el biofilm de aislados clínicos SASM. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. **(A)** Efecto del EHT en el aislado clínico SASM 62600/15 que es buen formador de biofilm. **(B)** Efecto del EHT en el aislado clínico SASM 60040/19 que es mal formador de biofilm. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

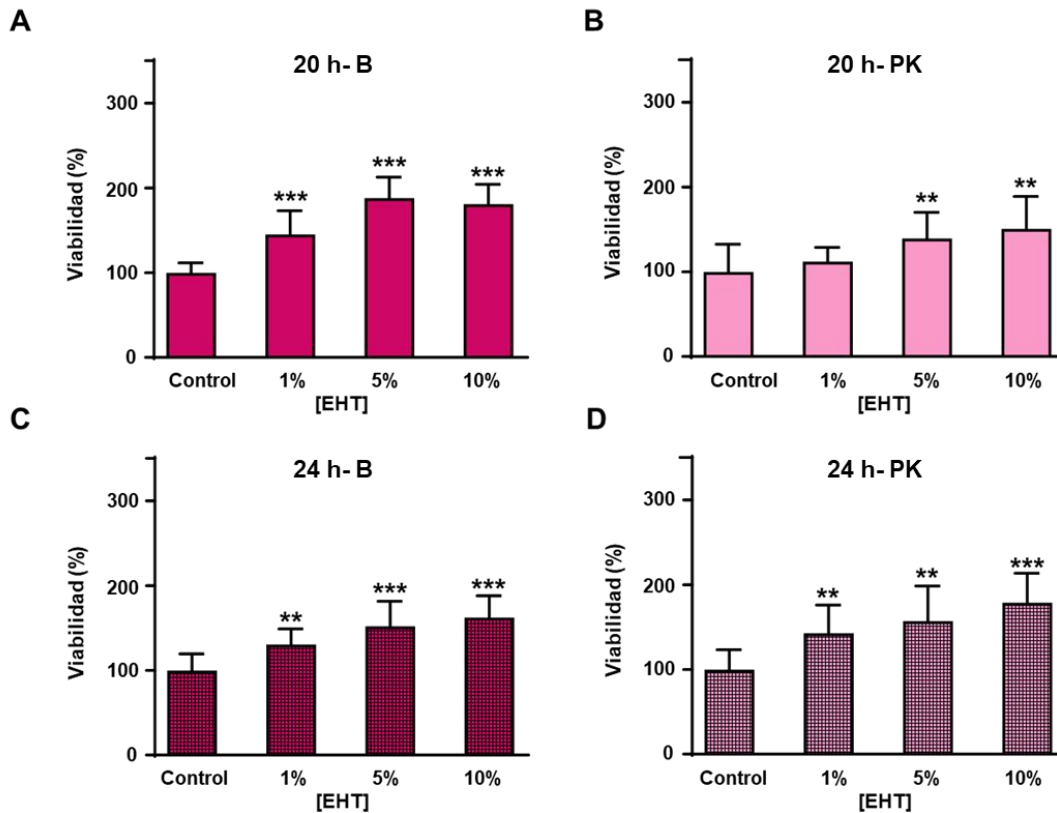


**Figura 62.** Análisis de los efectos del EHT en el biofilm de aislados clínicos SARM. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. **(A)** Efecto del EHT en el aislado clínico SARM 60335/19 que es buen formador de biofilm. **(B)** Efecto del EHT en el aislado clínico SARM 62822/15 que es mal formador de biofilm. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\*\* $P < 0.001$ ).

Se observó también un aumento significativo en la viabilidad de las bacterias planctónicas del biofilm, siendo este aumento mayor que el observado en las bacterias integrantes del propio biofilm cuando se expusieron a 10% de EHT con respecto al control (**Figura 63B y D**). El efecto del EHT en el aislado clínico considerado como buen formador de biofilm fue similar en ambos tiempos de incubación del biofilm.



**Figura 63.** Efecto del EHT en la viabilidad del biofilm del aislado clínico SARM 60335/19 que es buen formador de biofilm. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. (**A y C**) Efecto del EHT en el biofilm del aislado clínico SARM 60335/19 a las 20 y 24 h. (**B y D**) Efecto del EHT en el cultivo planctónico del aislado clínico SARM 60335/19 a las 20 y 24 h. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).



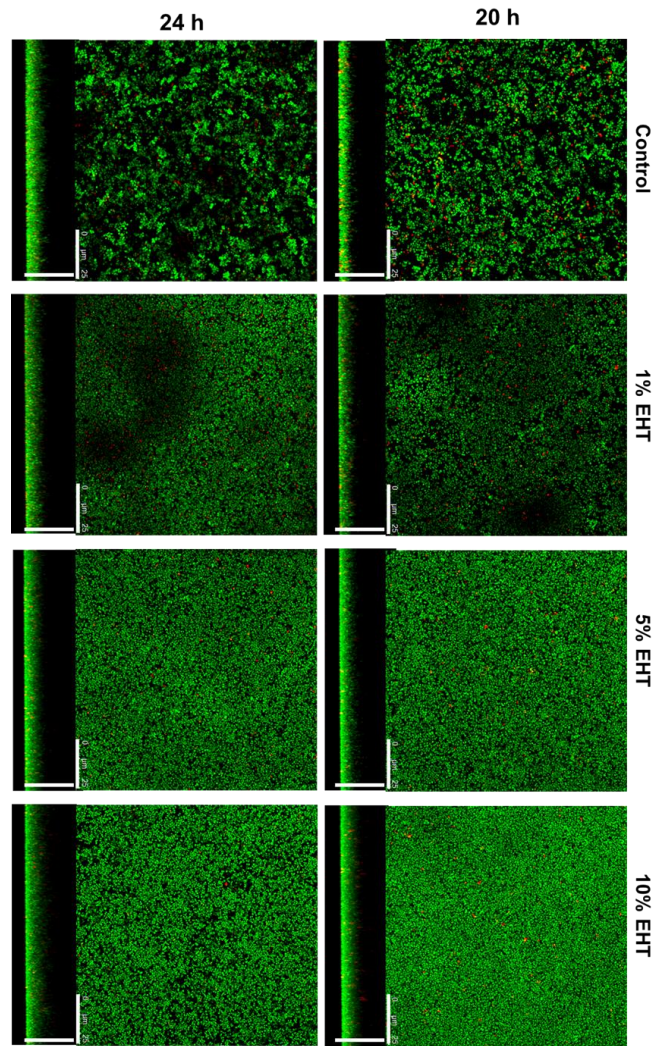
**Figura 64.** Efecto del EHT en la viabilidad del biofilm del aislado clínico SARM 62822/15 que es mal formador de biofilm. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. **(A y C)** Efecto del EHT en el biofilm del aislado clínico SARM 62822/15 a las 20 y 24 h. **(B y D)** Efecto del EHT en el cultivo planctónico del aislado clínico SARM 62822/15 a las 20 y 24 h. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

Por otro lado, con el aislado clínico que era mal formador de biofilm a las 24 h, se observa a las 20 y 24 h, un efecto significativo del EHT en la viabilidad del biofilm, aumentando su viabilidad hasta un 70–100%, respecto al control con 5–10% de EHT (**Figura 64A y C**). Con esta cepa clínica se observó un efecto significativo con 1% de EHT en la viabilidad de las bacterias del biofilm, efecto que no se obtuvo cuando se analizó la biomasa mediante CV (**Figuras 62 y 64**). También, al contrario que en los

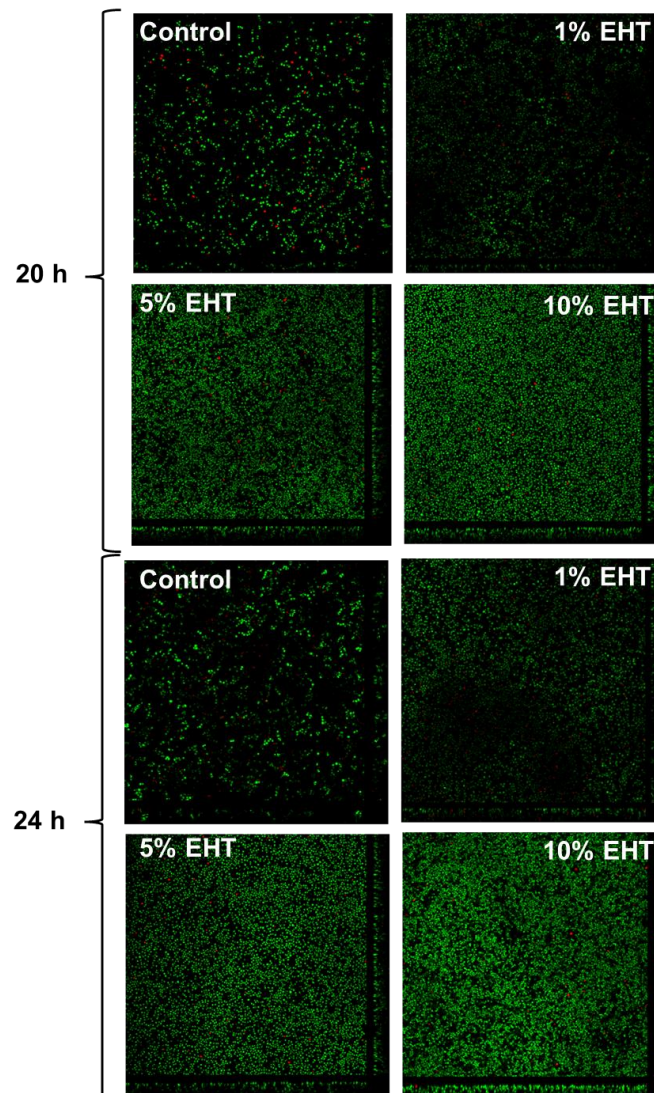
resultados obtenidos con CV, se obtuvo efecto en las células viables del cultivo planctónico por el EHT con concentraciones superiores al 5%, sobre todo a las 24 h (**Figura 64B y D**). Estos resultados demuestran que, en la cepa clínica considerada como buena formadora de biofilm, el mayor aumento en viabilidad respecto al control se producía en el cultivo planctónico del biofilm, aunque también se producía en el biofilm (**Figura 63**). Mientras que en el aislado clínico que era mal formador de biofilm se produce un incremento principalmente en el biofilm, aunque también se producía en el cultivo planctónico del biofilm (**Figura 64**).

Por último, se caracterizó el efecto del EHT en la estructura y viabilidad de estos biofilms mediante CLSM. Se utilizaron los mismos aislados clínicos SARM (buenos y malos formadores de biofilm) con los que se caracterizó el efecto del EHT en las células viables. En el aislado clínico SARM 60335/19 (buen formador de biofilm) se puede observar un biofilm muy estructurado en los controles a 20 y 24 h (**Figura 65**). Cuando se exponen a 1% de EHT comienzan a perder estructura estos biofilms, y se observan biofilms con menor espesor y más homogéneos (**Figura 65**). Posteriormente, con 5% y 10% de EHT se observan biofilms homogéneos, sin agrupaciones bacterianas y mayor densidad celular (**Figura 65**). En la **Figura 66** se muestran las proyecciones ortogonales de los biofilms a ambos tiempos y con las diferentes proporciones de EHT. Se puede observar que, según aumenta la concentración de EHT, el biofilm incrementa su densidad celular en cada plano y su grosor (**Figura 66**).

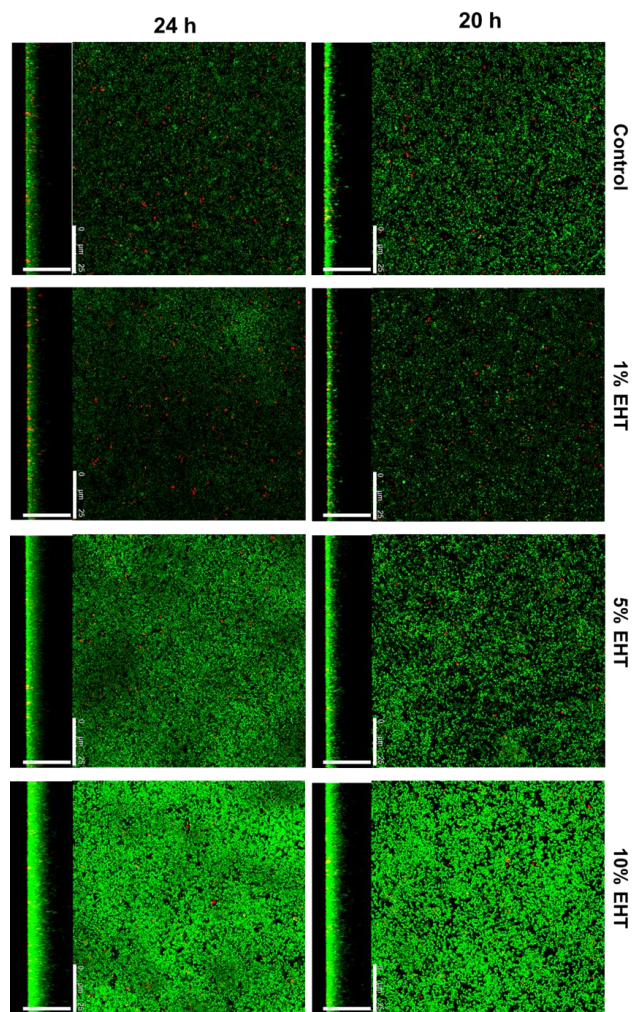
Respecto al aislado clínico 62822/15 (mal formador de biofilm), se puede visualizar cómo sus controles son menos estructurados y más finos a las 20 y 24 h respecto a al biofilm de la cepa anterior que es buena formadora de biofilm (**Figuras 65 y 67**). En la cepa 62822/15 (mala formadora de biofilm), el EHT incrementa la densidad celular y el grosor del biofilm (**Figura 67**). Este incremento es más llamativo que en la cepa 60335/19 (buena formadora de biofilm). Esto también se corrobora en las proyecciones ortogonales, donde con 5–10% de EHT el biofilm tuvo una densidad celular y grosor mayores (**Figura 68**). Este fenómeno se observa tanto a las 20 como a las 24 h, momentos en el que este aislado es cuando forma menos biofilm (Capítulo 3 de esta Memoria).



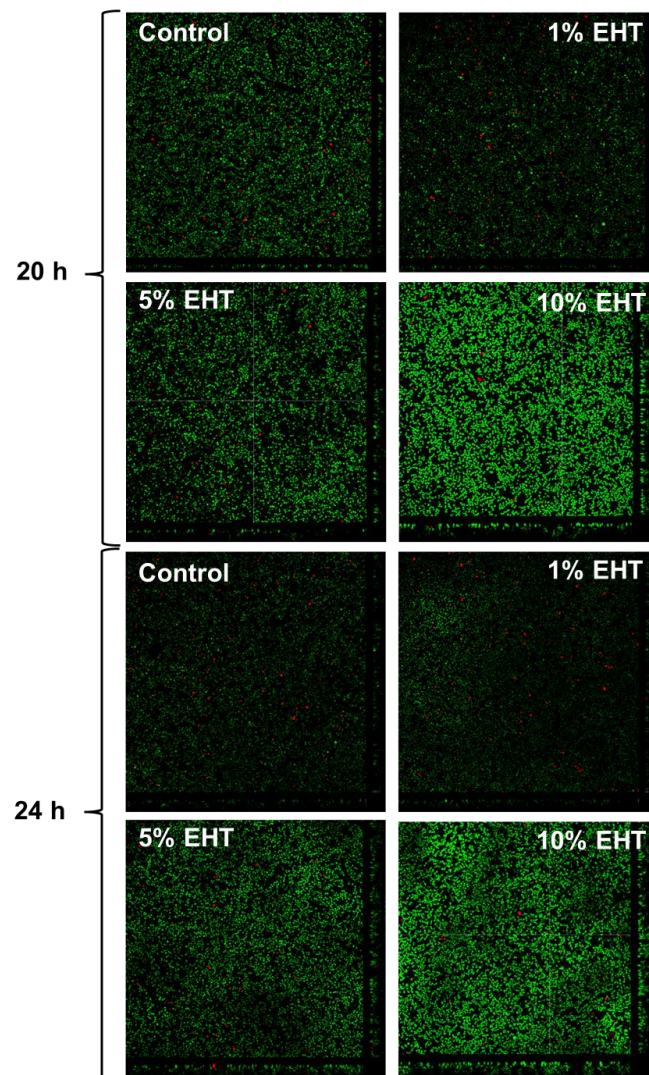
**Figura 65.** CLSM del aislado clínico SARM 60335/19 (buen formador de biofilm) en presencia de diferentes concentraciones de EHT. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10 %) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables rojas [yoduro de propidio (IP)]. Proyecciones x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5 μm) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0 μm). Las barras indican 25 μm.



**Figura 66.** CLSM del aislado clínico SARM 60335/19 (buen formador de biofilm) en presencia de diferentes concentraciones de EHT. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10 %) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables, rojas (IP). Proyecciones ortogonales x-y (captura de imágenes a intervalos de 0.5  $\mu\text{m}$ ) y x-z (captura de imágenes a intervalos de 5  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 67.** CLSM del aislado clínico SARM 62822/15 (mal formador de biofilm) en presencia de diferentes concentraciones de EHT. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10 %) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables, rojas (IP). Proyecciones x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5  $\mu\text{m}$ ) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0  $\mu\text{m}$ ). Las barras indican 25  $\mu\text{m}$ .



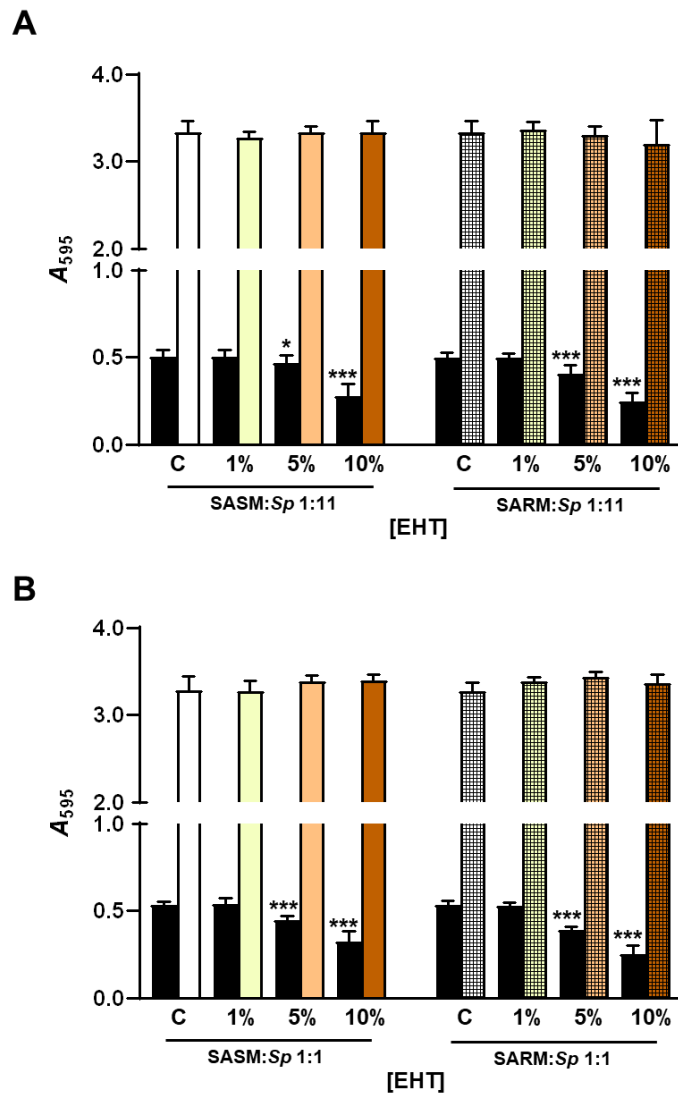
**Figura 68.** CLSM del aislado clínico SARM 62822/15 (mal formador de biofilm) en presencia de diferentes concentraciones de EHT. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10 %) y se incubaron durante 20 o 24 h a 37 °C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables, rojas (IP). Proyecciones ortogonales x-y (captura de imágenes a intervalos de 0.5  $\mu\text{m}$ ) y x-z (captura de imágenes a intervalos de 5.0  $\mu\text{m}$ ).

## 5.2. Efecto del EHT en biofilms mixtos de *S. aureus*- *S. pneumoniae*

Como se mencionó anteriormente, existen trabajos previos que han investigado el efecto del EHT en los biofilms de *S. aureus* (Kulkarni *et al.*, 2012, Lacoma *et al.*, 2019) y *S. pneumoniae* (Mutepe *et al.*, 2013). Sin embargo, no hay en la literatura resultados previos del efecto del EHT en biofilms multiespecie. Se ha descrito una relación oxidativa en la interacción entre *S. aureus* y *S. pneumoniae*, ya que neumococo puede generar radicales hidroxilo procedentes del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wu *et al.*, 2019). Adicionalmente, se observó que para que el EHT tuviese un efecto positivo sobre el biofilm de *S. aureus*, era necesario que se produjese estrés oxidativo producido por las diferentes especies reactivas de oxígeno O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, ·OH, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kulkarni *et al.*, 2012). Por tanto, resulta de gran interés estudiar la interacción entre estos patógenos en las condiciones oxidativas del EHT.

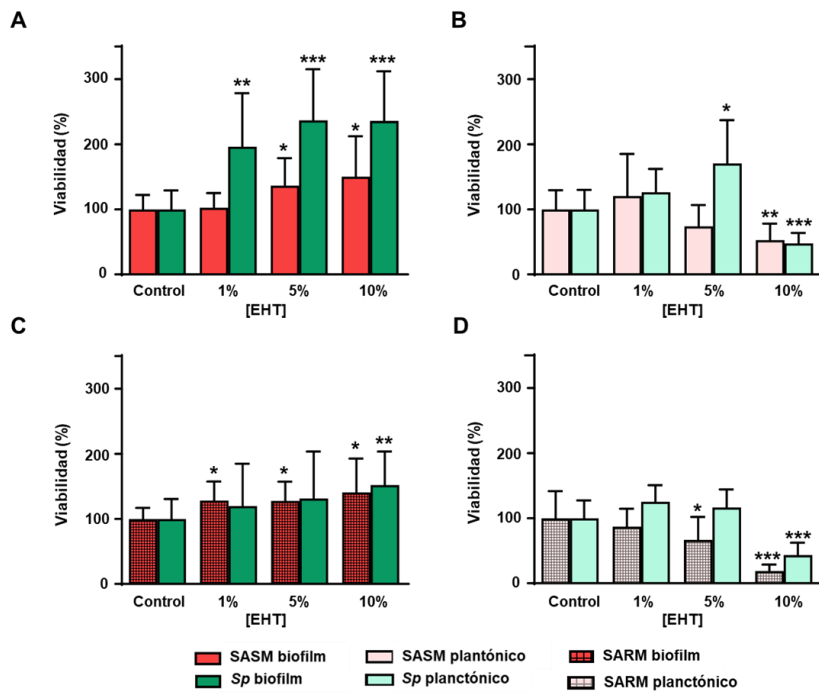
Al igual que con los biofilms monoespecíficos de *S. aureus*, se empezó caracterizando el efecto del EHT en los biofilms mixtos mediante tinción por CV usando como soporte placas multipocillo de poliestireno (**Figura 69**). Para estos ensayos se escogieron los dos sistemas SASM/SARM: *Sp* con ambas proporciones 1:11 y 1:1. Al realizar los ensayos con tinción por CV se encontró que el EHT no tenía un efecto sobre el biofilm, en ninguno de los casos (**Figura 69**), pudiendo deberse a la saturación del sistema y, por lo tanto, a la capacidad limitada de detección por absorbancia, como ocurría en el caso de los aislados clínicos de *S. aureus* que eran buenos formadores de biofilm (**Figuras 61 y 62**). En cambio, se observó el efecto contrario en el crecimiento total al observado con los biofilms individuales de *S. aureus*, ya que, a concentraciones crecientes de EHT, se observó una disminución del crecimiento total de hasta la mitad de A<sub>595</sub> (**Figura 69**).

En un paso posterior se caracterizó el efecto del EHT en la viabilidad de los sistemas de biofilm mixto y, de esta manera, poder observar tanto los cambios en el biofilm como en el cultivo planctónico del biofilm (**Figuras 70 y 71**). En el biofilm del sistema 1:11 SASM:*Sp* se puede observar que la viabilidad de los dos patógenos aumentaba con concentraciones crecientes de EHT respecto al control (**Figura 70A**), llegando la población de neumococo a ser del doble con 10% de EHT en comparación al control.

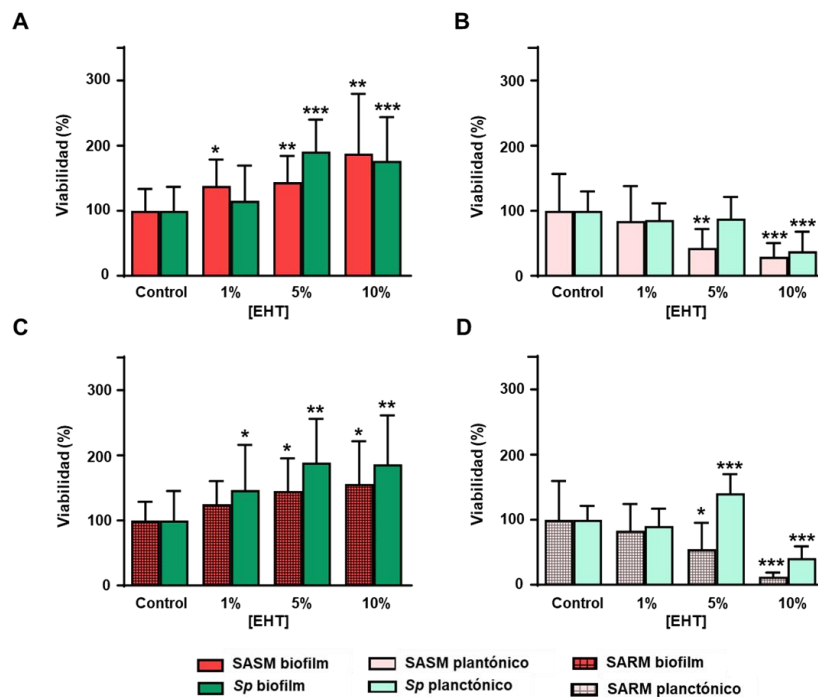


**Figura 69.** Análisis de los efectos del EHT en los biofilms mixtos SASM/SARM:Sp en las proporciones 1:11 y 1:1. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 5 h a 34 °C. **(A)** Efecto del EHT en el aislado clínico SARM 60335/19 que es buen formador de biofilm. **(B)** Efecto del EHT en el aislado clínico SARM 62822/15 que es mal formador de biofilm. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

Por el contrario, en el cultivo planctónico del biofilm se aprecia que la población de *S. aureus* empieza a decaer a partir de 5% de EHT y se observa una disminución de hasta casi la mitad en ambas poblaciones cuando se exponen al 10% (**Figura 70B**) que podría ser la causa de la caída de  $A_{595}$  del crecimiento total observada anteriormente (**Figura 69**). En el sistema SARM:*Sp* 1:11 también se observa este aumento en la viabilidad de ambas poblaciones en el biofilm aunque de forma más leve (**Figura 70C**), observando la misma disminución en el cultivo planctónico del biofilm tanto en *S. aureus* como en *S. pneumoniae* (**Figura 70D**).



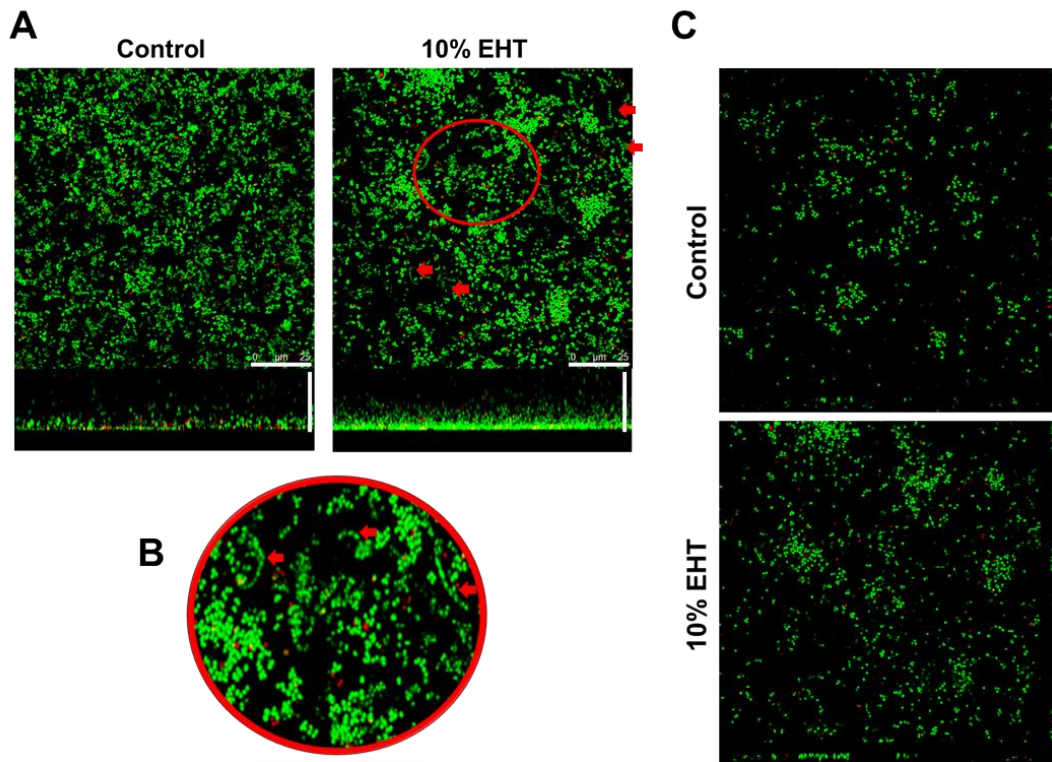
**Figura 70.** Análisis de los efectos del EHT en la viabilidad de los biofilms mixtos SASM/SARM:*Sp* 1:11. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 5 h a 34°C. (**A y C**) Efecto del EHT en el biofilm de los sistemas SASM/SARM:*Sp* 1:11. (**B y D**) Efecto del EHT en el cultivo planctónico de los sistemas SASM/SARM:*Sp* 1:11. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ).



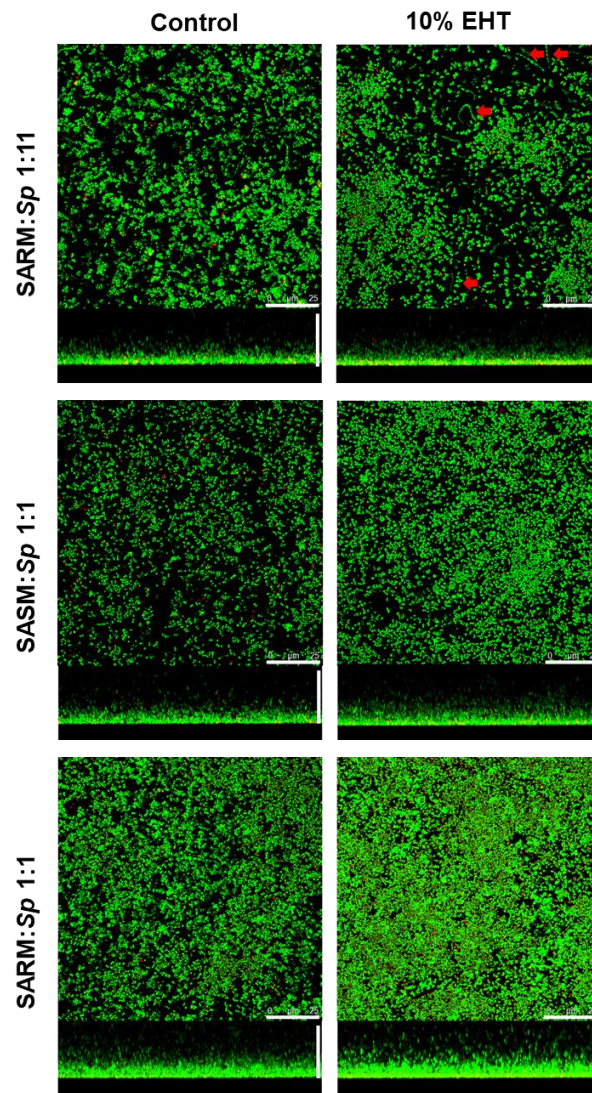
**Figura 71.** Análisis de los efectos del EHT en la viabilidad de los biofilms mixtos SASM/SARM:Sp 1:1. Los biofilms se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10%) y se incubaron durante 5 h a 34°C. **(A y C)** Efecto del EHT en el biofilm de los sistemas SASM/SARM:Sp 1:1. **(B y D)** Efecto del EHT en el cultivo planctónico de los sistemas SASM/SARM:Sp 1:1. Se muestran las barras de desviación estándar y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (*t* de Student de dos colas: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001).

En la **Figura 71** se puede observar el efecto del EHT sobre la viabilidad de los biofilms mixtos SASM/SARM:Sp con la proporción 1:1. En todos los casos se aprecia el mismo fenómeno de aumento de viabilidad de ambas poblaciones en el biofilm mixto, alcanzando su máximo con 10% de EHT (**Figura 71A y C**), asociado a una disminución de más de la mitad de las poblaciones en el cultivo planctónico del biofilm con esa concentración (**Figura 71B y D**). Este efecto de la viabilidad en el cultivo planctónico del biofilm fue más marcado en la población de *S. aureus* que en la de *S. pneumoniae* en todos los casos menos en el sistema SASM:Sp 1:11 (**Figuras 70 y 71**).

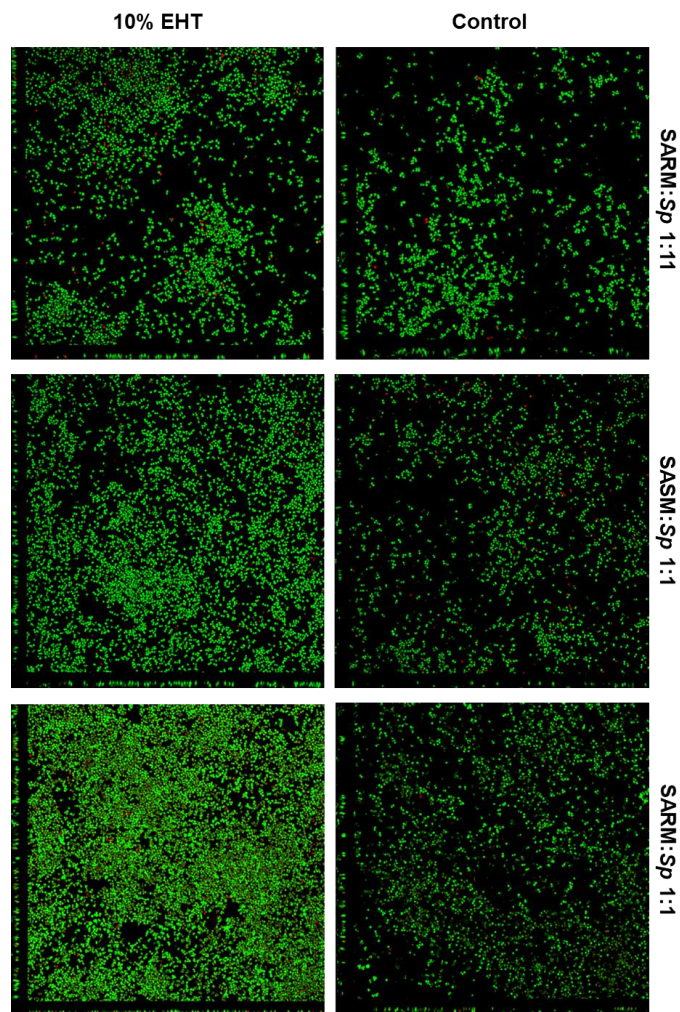
Por último, se caracterizó este efecto del EHT en los biofilms mixtos mediante CLSM. Al exponer al sistema SASM:Sp 1:11 a las diferentes concentraciones de EHT (1, 5 y 10 %) no se observaron diferencias con un 1% o 5% de EHT (datos no mostrados), así que, posteriormente, se observaron todos los sistemas comparando el control con el tratado con 10% de EHT (**Figuras 72, 73 y 74**). En ambos sistemas de biofilm mixto, analizando las diferentes proporciones, se pudo observar un aumento del biofilm al exponerlo al EHT (**Figuras 72, 73 y 74**). Uno de los fenómenos que ocurrieron al exponer ambos sistemas de biofilm mixto con las proporciones 1:11 a 10% de EHT fue la aparición de múltiples cadenas de neumococo que no se habían observado previamente en los controles (**Figuras 72 y 73**). En la **Figura 72** se observa con más detalle en el sistema SASM:Sp 1:11 en el que no sólo se ve un aumento de la densidad celular en el biofilm y en su grosor, sino que se apreciaba como se crean ciertos acúmulos. Además, con 10% de EHT aparecían cadenas de neumococo a lo largo del biofilm (**Figura 72A y B**). En la **Figura 73** se puede observar un aumento en la densidad y grosor en el biofilm mixto SARM:Sp 1:11 y cómo aparecen esas cadenas en todo el biofilm. En el caso de los sistemas SASM/SARM:Sp 1:1 se puede apreciar una mayor cantidad de biofilm en el control que en los sistemas 1:11 y cómo aumenta con 10% de EHT tanto en densidad como en grosor en las proyecciones máximas (**Figura 73**) y las proyecciones ortogonales (**Figura 74**). Por último, en las proyecciones ortogonales de todos los sistemas se puede apreciar que, en presencia de EHT, se produce una mayor acumulación bacteriana y un aumento del grosor del biofilm (**Figuras 72C y 74**).



**Figura 72.** CLSM del biofilm mixto SASM:Sp 1:11 expuesto a 10% de EHT. El biofilm se expuso a 10% de EHT y se incubó durante 5 h a 34°C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad BacLight LIVE/DEAD siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables, rojas (IP). **(A)** Proyecciones x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5 μm) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0 μm). Las flechas rojas señalan las cadenas de *S. pneumoniae* observadas. Las barras indican 25 μm. **(B)** Detalle de las cadenas de la proyección máxima x–y mostrada en el panel A. **(C)** Proyecciones ortogonales x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5 μm) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0 μm).



**Figura 73.** CLSM de los biofilms mixtos SARM:Sp 1:11 y SASM/SARM:Sp 1:1 expuestos a 10% de EHT. Los biofilms se expusieron a 10% de EHT y se incubaron durante 5 h a 34°C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables, rojas (IP). Proyecciones x–y (captura de imágenes a intervalos de 0.5 µm) y x–z (captura de imágenes a intervalos de 5.0 µm). Las barras indican 25 µm.



**Figura 74.** CLSM de los biofilms mixtos SARM:Sp 1:11 y SASM/SARM:Sp 1:1 expuestos a 10% de EHT. Los biofilms se expusieron a 10% de EHT y se incubaron durante 5 h a 34°C. Las células del biofilm se tiñeron con el kit de viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* siendo las células viables de color verde (Syto9) y las no viables, rojas (IP). Proyecciones ortogonales x-y (captura de imágenes a intervalos de 0.5  $\mu\text{m}$ ) y x-z (captura de imágenes a intervalos de 5.0  $\mu\text{m}$ ).

## 6. EFECTO DE LA VACUNA CONJUGADA NEUMOCÓCICA 13-VALENTE EN LA COLONIZACIÓN DE *S. PNEUMONIAE* Y *S. AUREUS*

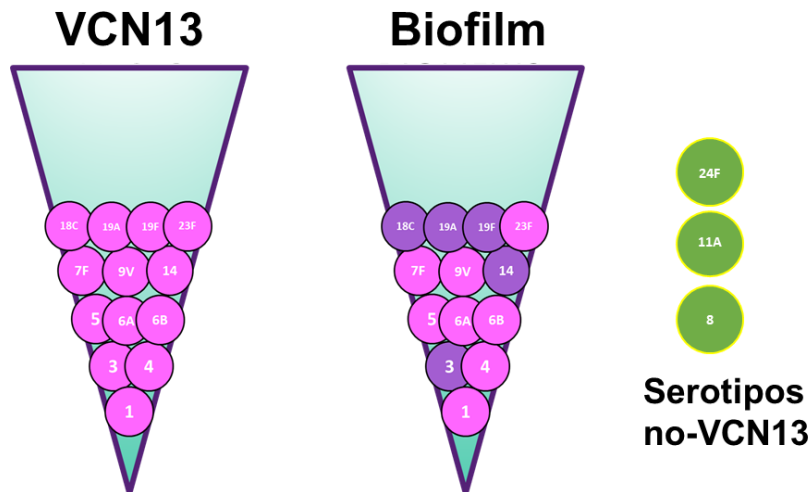
La eficacia de las vacunas conjugadas neumocócicas para reducir la ENI en población pediátrica y adulta ha sido demostrada (de Miguel *et al.*, 2020, Ouldali *et al.*, 2021). Además, desde la introducción de las VCN en población pediátrica, se ha observado un efecto indirecto en la población adulta (Moore *et al.*, 2015). La colonización nasofaríngea en neumococo es un prerrequisito para la diseminación a zonas estériles y producir ENI y es interesante destacar que este estado portador está asociado a la formación de biofilm (Domenech *et al.*, 2015). Con la VCN13 se ha visto que no sólo tiene efecto frente a la ENI sino que también disminuye la neumonía neumocócica y el estado del portador (Dagan *et al.*, 2015, Bonten *et al.*, 2015, McLaughlin *et al.*, 2018). Como ya se había demostrado, el estado de biofilm evade mejor la inmunidad mediada por el complemento que cuando los neumococos se encuentran en estado planctónico (Domenech *et al.*, 2013).

A pesar de la vacunación con la VCN13, se siguen diagnosticando infecciones por serotipos incluidos en esta vacuna (Mokaddas *et al.*, 2021), siendo el más frecuente el serotipo 3 (Ladhani *et al.*, 2018, Sings *et al.*, 2021), pero también los serotipos 14, 19F y 19A (Moore *et al.*, 2015, Ladhani *et al.*, 2018, Glikman *et al.*, 2018). Además, pocos estudios han determinado el impacto en la colonización de la pauta vacunal utilizada en cada país por estos serotipos vacunales, y muchos tienen la limitación de basarse únicamente en datos epidemiológicos (Lewnard *et al.*, 2020). En la bibliografía, hay algún trabajo en el que no encuentran efectividad de la VCN13 frente a la colonización nasofaríngea por el serotipo 3 (Lewnard *et al.*, 2020).

### 6.1. Estudio de la evasión del sistema inmune por biofilms de serotipos vacunales de neumococo incluidos en la vacuna antineumocócica VCN13

Debido a la falta de estudios no epidemiológicos sobre cómo afecta la vacunación a la colonización por *S. pneumoniae* y la relación de la colonización con el estado de biofilm se probó una mezcla de sueros de pacientes vacunados con la VCN13 frente a biofilms de serotipos vacunales (14, 18C, 19F, 19A y 3) y serotipos no VCN13 (8, 11A y 24F) (**Figura 75**). Los sueros utilizados en esta Memoria, pertenecen a adultos jóvenes sanos (media de edad 22–45 años) no vacunados frente a *S. pneumoniae*

(suero preinmune o P) y después de un mes de vacunación con la VCN13 (suero inmune o I).



**Figura 75.** Serotipos VCN13 seleccionados para el presente estudio. Los cinco serotipos VCN13 marcados en malva son los seleccionados para el estudio de biofilm junto con los tres serotipos no-VCN13 de color verde.

Antes de la realización de los ensayos de evasión del sistema inmune por biofilms de serotipos VCN13, se realizó una titulación o determinación de anticuerpos funcionales de los sueros utilizados. Estos títulos se definieron como la dilución de suero que produce una reducción del 50% de las UFC por fagocitosis mediada por el complemento siguiendo las recomendaciones internacionales (Romero-Steiner *et al.*, 1997) (**Tabla 16**). En los sueros preinmiunes, se puede observar que sólo los sujetos 1, 2 y 4 no presentaban ningún tipo de inmunidad previa frente a los serotipos estudiados, mientras que los sujetos 3 y 5 sí que tenían título de anticuerpos frente a los serotipos 3, 19A y 24F y frente a los serotipos 11A y 24F, respectivamente (**Tabla 16**). Respecto a la inmunidad posterior a la vacunación, todos los sujetos respondieron a los serotipos 19F y 19A, 4 sujetos de 5 respondieron frente al serotipo 3, 3 sujetos de 5 frente al serotipo 18C y sólo 2 de 5 sujetos frente al serotipo 14. Sólo el sujeto 2 no

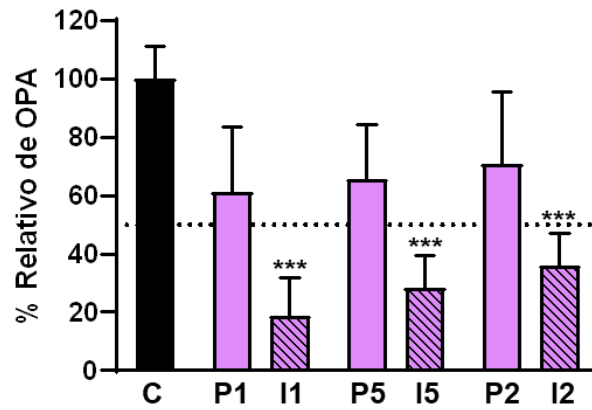
tenía inmunidad previa a ningún serotipo de los probados y respondió a todos los serotipos una vez vacunado (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Título de anticuerpos funcionales frente a los serotipos VCN13 y no VCN13 utilizados durante el estudio. P, suero preinmune; I, suero inmune; N, sin título.

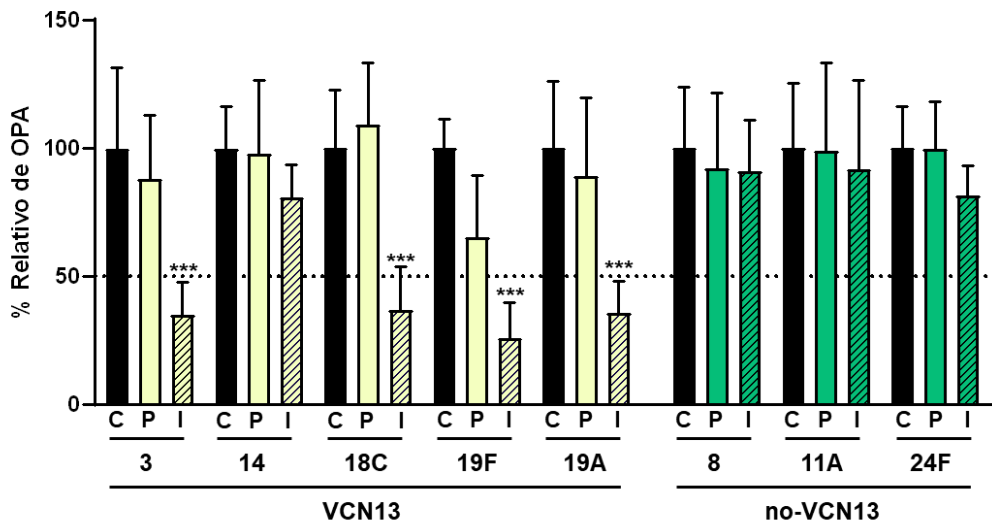
| Serotipo | Sueros |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|          | P1     | I1 | P2 | I2 | P3 | I3 | P4 | I4 | P5 | I5 |
| 3        | N      | 4  | N  | 4  | 8  | 4  | N  | N  | N  | 4  |
| 14       | N      | N  | N  | 4  | N  | N  | N  | 4  | N  | N  |
| 18C      | N      | N  | N  | 4  | N  | 8  | N  | N  | N  | 4  |
| 19F      | N      | 4  | N  | 4  | N  | 4  | N  | 4  | N  | 4  |
| 19A      | N      | 8  | N  | 4  | 4  | 32 | N  | 32 | N  | 4  |
| 8        | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 11A      | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  | N  | 4  | 4  |
| 24F      | N      | N  | N  | N  | 4  | 4  | N  | N  | 4  | 4  |

Tras la titulación, se seleccionaron 3–4 sueros para probar la respuesta de sueros inmunes al biofilm de cada serotipo. Se cuantificó la opsonofagocitosis (OPA) por recuento de viables de los biofilms de serotipos descritos, expuestos a sueros inactivados humanos de individuos sanos antes y después de ser vacunados con VNC13.

En la **Figura 76** se puede observar el efecto de los sueros inmunes y preinmunes de tres sujetos en un biofilm producido por una cepa multirresistente de *S. pneumoniae* serotipo 19F. Se representó el porcentaje relativo de OPA, donde a mayor porcentaje, mayor supervivencia a la opsonofagocitosis. Se observa que la vacuna VCN13 protege entre un 60–80% a los individuos vacunados frente al biofilm producido por el serotipo 19F y, por tanto, frente a la posible colonización por este serotipo (**Figura 76**). Esto mismo se realizó utilizando al menos tres sueros pre y posinmunes de diferentes sujetos para los serotipos mostrados en la **Figura 75**, cuyos resultados se muestran en la **Figura 77**.



**Figura 76.** Oponofagocitosis del biofilm del serotipo 19F con diferentes sueros. Los sueros de los sujetos se inactivaron y se añadió una fuente de complemento de conejo. C, control de complemento; P, suero preinmune; I, suero inmune.



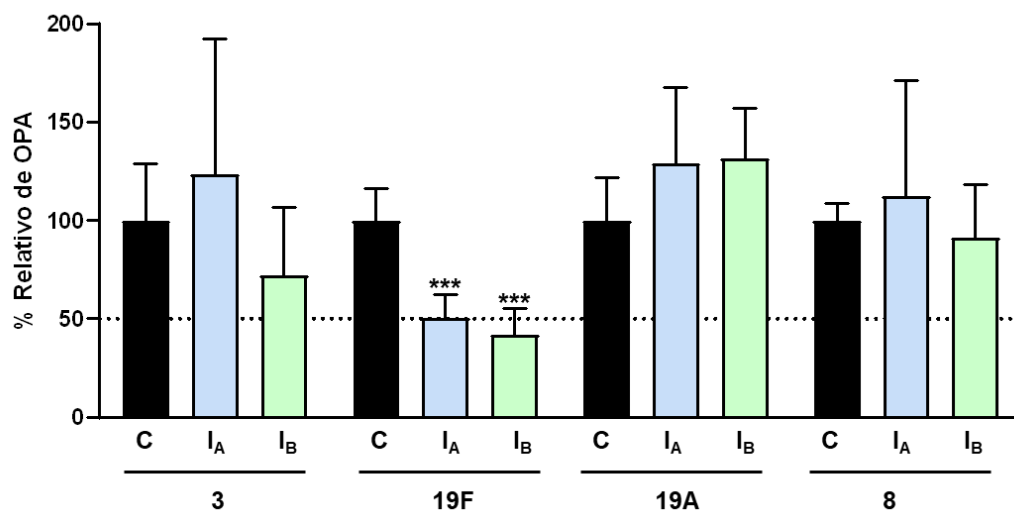
**Figura 77.** Oponofagocitosis del biofilm de los serotipos VCN13 y no-VCN13 con diferentes sueros. Los sueros de los sujetos se inactivaron y se añadió una fuente de complemento de conejo. C, control de complemento; P, suero preinmune; I, suero inmune.

Con la VCN13 se obtuvo inmunidad frente a los biofilms de todos los serotipos VCN13 menos para el serotipo 14 y no se obtuvo inmunidad frente a ninguno de los serotipos no-VCN13 (**Figura 77**). Los sueros inmunes que se utilizaron pertenecían a sujetos que no poseían anticuerpos protectores previamente a la vacunación.

## **6.2. Evaluación de sueros de pacientes con tratamientos de metotrexato y rituximab vacunados con la VCN13 o PPV23**

Una vez analizada la respuesta inmune a la colonización por serotipos vacunales y no vacunales de pacientes sanos, se evaluaron sueros de dos pacientes con artritis reumatoide (AR), una enfermedad autoinmune, sometidos a tratamientos sintéticos y biológicos con metotrexato y rituximab. Estos pacientes con artritis reumatoide no sólo tienen más riesgo relativo de sufrir ENI (Wotton y Goldacre, 2012, Backhaus *et al.*, 2016), sino que el tratamiento con terapias biológicas está asociado a una respuesta inmune defectuosa que podría llevar a una pérdida de la eficacia de las vacunas antineumocócicas (Loubet *et al.*, 2015).

De los dos sueros estudiados, el paciente A estaba vacunado sólo con VNP23, mientras que el paciente B se vacunó con la pauta secuencial recomendada VNP23 + VCN13. En este caso, se analizaron sólo tres serotipos VCN13 y VNP23 (3, 19F y 19A) y un serotipo no VCN13, pero sí VNP23 (8) (**Figura 78**). Para estos ensayos solo se disponía de suero posvacunación. Al realizar los ensayos de opsonofagocitosis con estos sueros frente a los biofilms de los cuatro serotipos probados se pudo comprobar que los sueros inmunes no protegieron frente a la colonización de ningún serotipo excepto del serotipo 19F, con un valor de protección de 50–55% en este biofilm (**Figura 78**). Ninguno de los dos pacientes mostró protección frente a los biofilms de los serotipos 3, 19A y 8 por lo que, en teoría, no estarán protegidos frente a la colonización o frente a infecciones crónicas asociadas a biofilms, como podría ser la EPOC producida por estos serotipos.



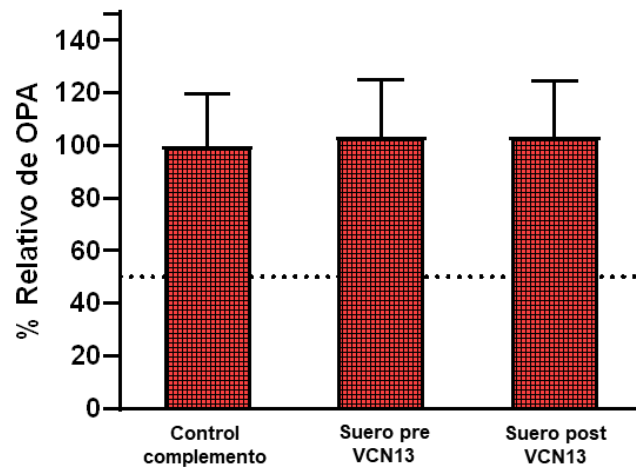
**Figura 78.** Opsonofagocitosis del biofilm de los serotipos VCN13 y VNP23 con dos sueros de pacientes con artritis reumatoide sometidos a tratamiento con metotrexato y rituximab. Los sueros inmunes de los pacientes se inactivaron y se añadió una fuente de complemento de conejo. C, control de complemento; IA, suero inmune paciente A; IB, suero inmune paciente B.

### 6.3. Impacto de la vacunación con la VCN13 en la colonización de *S. aureus*

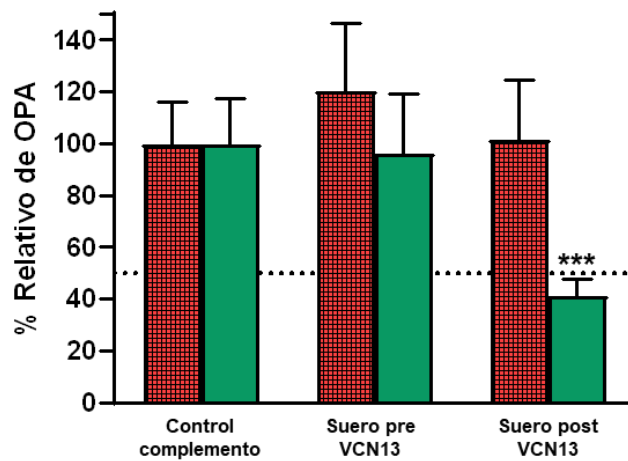
Previamente en esta Memoria se comentó acerca de la cocolonización por *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Desde la introducción de la VCN7 se han publicado estudios epidemiológicos que mostraron una relación negativa entre serotipos VCN7 y *S. aureus*, describiéndose una disminución por serotipos vacunales de *S. pneumoniae* y un aumento de la colonización por *S. aureus* (Regev-Yochay *et al.*, 2004, Spijkerman *et al.*, 2012, Chien *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2013). Por otro lado, han aparecido estudios

mostrando que la vacunación frente a neumococo no modificaba la colonización de la nasofaringe de *S. aureus* en la población vacunada (Cohen *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009). También se han publicado estudios observando que la implantación de la VCN13 en niños disminuyó la colonización por *S. aureus* no sólo de la nasofaringe sino también del oído medio (Leach *et al.*, 2016).

Debido a estos resultados contradictorios, se analizó si VCN13 tendría efecto sobre los biofilms de *S. aureus*, que pudieran asociarse a la colonización. Se observó que la vacunación con VCN13 no redujo el biofilm mono-específico de *S. aureus*, ya que el suero inmune post VCN13 no afectaba al biofilm de *S. aureus* (**Figura 79**). Además, se probó si este suero inmune afectaba a *S. aureus* y a *S. pneumoniae* cuando se encontraban formando un biofilm mixto, utilizando el sistema SARM:Sp 1:11 donde ambas poblaciones de patógenos son similares a las 5 h de formación del biofilm mixto. Además, este biofilm mixto está formado por una cepa de *S. pneumoniae* 19A, serotipo incluido en la VCN13. Como se observa en la **Figura 80**, el suero inmune VCN13 no aumentó la fagocitosis de la población de *S. aureus* en el biofilm mixto, pero sí que hubo una reducción de la viabilidad de, aproximadamente, el 60% de *S. pneumoniae* 19A en el biofilm mixto, similares a lo observado en el biofilm individual (**Figura 77**). Estos resultados indican que la vacunación con VCN13 reduce el biofilm mono-especie de *S. pneumoniae* 19A (**Figura 77**) pero también el biofilm de neumococo cuando forma un biofilm mixto con *S. aureus*, sin afectar a la población de *S. aureus* (**Figura 80**).

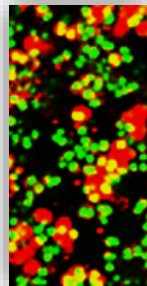


**Figura 79.** Opsonofagocitosis del biofilm mono-específico de *S. aureus* con sueros pre e inmunes VCN13. Los sueros inmunes de los sujetos vacunados se inactivaron y se añadió una fuente de complemento de conejo.

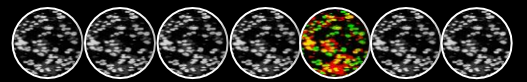


**Figura 80.** Opsonofagocitosis del biofilm mixto SARM:Sp 1:1 con sueros pre e inmunes VCN13. Los sueros de los pacientes se inactivaron y se añadió una fuente de complemento de conejo. Las barras rojas con patrón representan a *S. aureus* y las barras verdes a *S. pneumoniae*.





## V. DISCUSIÓN





## 1. RELEVANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LOS SEROTIPOS 22F Y 33F INCLUIDOS EN LAS NUEVAS VACUNAS NEUMOCÓCICAS CONJUGADAS

La efectividad de las actuales vacunas conjugadas frente a los serotipos que se incluyen en las mismas ha sido más que demostrada, disminuyendo la carga de enfermedad neumocócica producida por estos serotipos (Liñares *et al.*, 2010, Ladhani *et al.*, 2013, Mackenzie *et al.*, 2016, Ladhani *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020). Sin embargo, desde la introducción de estas vacunas conjugadas, se ha producido el fenómeno denominado como reemplazo de serotipos (Weinberger *et al.*, 2011), y muchos países han notificado un incremento de casos ENI por serotipos no vacunales en los últimos años (Feikin *et al.*, 2013, Savulescu *et al.*, 2017, Ladhani *et al.*, 2018, Lewnard y Hanage, 2019, de Miguel *et al.*, 2020, Ouldali *et al.*, 2021). Este es el caso de los serotipos 22F y 33F en diferentes países, que han mostrado un aumento de casos por ambos serotipos tanto en niños como en adultos después de la introducción de la VCN13 (Kaplan *et al.*, 2013, Pichon *et al.*, 2013, Moore *et al.*, 2015, Golden *et al.*, 2016, Balsells *et al.*, 2017, Cui *et al.*, 2017, Golden *et al.*, 2021, Amin-Chowdhury *et al.*, 2021). Estos serotipos también tienen importancia en términos de años de vida ajustados por calidad (QALY), ya que produjeron la principal pérdida de QALY en niños entre todos los serotipos no-VCN13 (van Hoek *et al.*, 2012).

En España, hasta el último año preSARS-CoV-2 (2019), los datos muestran un incremento de casos ENI por los serotipos 22F y 33F, siendo significativo sólo en adultos, mientras que, en la población pediátrica, aunque se aprecia también un aumento, no es estadísticamente significativo para ninguno de los dos serotipos. Resulta interesante que el serotipo 22F en adultos no sólo ha aumentado significativamente en adultos  $\geq 65$  años, sino que también lo ha hecho en el grupo de edad de hasta 64 años, mientras que, para el serotipo 33F, el aumento de casos sólo es significativo en la población  $\geq 65$  años. El hecho de que el serotipo 22F esté siendo capaz de producir ENI en adultos independientemente de la edad puede explicar por qué el aumento de este serotipo está teniendo un mayor impacto que el del 33F en otros países (Golden *et al.*, 2016, Ladhani *et al.*, 2018). En Reino Unido, los casos por serotipos 22F y 33F aumentaron rápidamente al introducir la VCN7 y VCN13, representando actualmente el 7% y 3.5% del total de casos de ENI, respectivamente (Amin-Chowdhury *et al.*, 2021). La mayor carga de enfermedad se producía en adul-

tos  $\geq 65$  años, similar a los datos que hemos obtenido en España, y de hecho, observaron que dos tercios de los casos se producían en pacientes con otras comorbilidades como enfermedades respiratorias crónicas (Amin-Chowdhury *et al.*, 2021). Otros países europeos con diferentes pautas vacunales, han reportado una mayor carga de enfermedad en ENI por estos dos serotipos en niños y adultos (Balsells *et al.*, 2017, Levy *et al.*, 2019). En EE. UU., que tiene implementada una pauta vacunal 3 + 1 para la VCN13 en niños, los serotipos 22F y 33F fueron los principales serotipos no-VCN13 causando ENI en niños  $< 5$  años y adultos  $\geq 65$  años (Gonzalez *et al.*, 2006, Jacobs *et al.*, 2008, Pilishvili *et al.*, 2010, Moore *et al.*, 2015). Todos estos hallazgos confirman que sigue siendo necesaria la vigilancia activa de ambos serotipos para conocer el futuro impacto que pueden tener la implantación de VCN15 y VCN20 en los calendarios vacunales.

Desde la llegada de la pandemia producida por el virus respiratorio SARS-CoV-2, la incidencia de otros patógenos como *S. pneumoniae* ha disminuido notablemente, habiéndose observado una caída importante en la incidencia de ENI en muchos países (Casanova *et al.*, 2021, Brueggemann *et al.*, 2021). Por ello es interesante analizar cómo las medidas frente al SARS-CoV-2 han afectado a la epidemiología de la ENI. Ya se conoce que *S. pneumoniae* puede coinfectar a pacientes con COVID-19 (moderado o severo) (Soto *et al.*, 2021, Cohen *et al.*, 2021) pero, apenas hay datos recientes de cómo ha afectado a la ENI en diferentes países. En los serotipos 22F y 33F hemos visto una caída significativa en la incidencia de ambos serotipos en población pediátrica y adulta al comparar 2020 vs. 2017–2019 y esta tendencia descendente de casos se podría seguir observando en 2021 donde sólo se disponían de datos epidemiológicos del primer semestre. Aun así, dentro del total de casos de ENI, el porcentaje de ambos serotipos en las diferentes poblaciones se mantiene, por lo que una vuelta a la normalidad cuando ya no se apliquen medidas no farmacológicas como distancia social, uso de mascarilla, etc., podría implicar de nuevo un aumento de casos ENI causados por estos dos serotipos incluidos en las futuras vacunas VCN15 y VCN20.

La diseminación de clones de neumococo en la población implica el aumento de genotipos hipervirulentos o asociados a resistencia antibiótica que puede llevar a la expansión de ciertos serotipos y genotipos (Brueggemann y Spratt, 2003, Ardanuy *et al.*, 2014, Aguinagalde *et al.*, 2015, Azarian *et al.*, 2018). Nuestros datos sobre los

clones circulantes de ambos serotipos, demuestran que el genotipo ST433 es la causa más frecuente de ENI en aislados clínicos del serotipo 22F. Esto es consistente con los datos de otros países, como en Canadá, donde más del 90% de casos del serotipo 22F pertenecen al ST433 (Golden *et al.*, 2021) y en Reino Unido donde se observa una situación similar (Amin-Chowdhury *et al.*, 2021). A pesar de esto, los datos con las cepas de nuestro estudio muestran menos clonalidad en este serotipo que la encontrada en estudios previos (Golden *et al.*, 2016, Golden *et al.*, 2021). Estos resultados contrastan con un estudio en Brasil donde solo se encontró el clon ST6403, no relacionado con el ST433, como único causante de casos del serotipo 22F (Christophe *et al.*, 2018). Para el serotipo 33F, se encontraron cinco genotipos diferentes pero la mayoría pertenecientes al CC717, siendo por lo tanto muy clonal, algo parecido a la situación de Reino Unido (Amin-Chowdhury *et al.*, 2021). En Canadá se observó otra situación diferente, donde el ST100 era el más predominante y encontraron que el serotipo 33F era muy poco clonal y, por tanto, más diverso (Golden *et al.*, 2016, Golden *et al.*, 2021). Esto demuestra la existencia de diferencias geográficas respecto a la clonalidad de los serotipos de *S. pneumoniae*.

Como ya previamente se había mencionado en esta Memoria, la formación de biofilm es una buena herramienta para predecir el impacto clínico y la emergencia de nuevos serotipos con capacidad de colonizar la nasofaringe después de la introducción de las nuevas vacunas (Domenech *et al.*, 2014, Domenech *et al.*, 2015). En este sentido, se ha observado que el serotipo 19A era muy buen formador de biofilm y tenía una capacidad muy elevada para colonizar la nasofaringe (Domenech *et al.*, 2014). Esta habilidad de formar biofilms densos puede contribuir a la patogénesis del serotipo 19A y podría explicar por qué es uno de los serotipos más predominantes a pesar de estar incluido en la VCN13 (Domenech *et al.*, 2014, Ladhani *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020). Esto mismo podría explicar el incremento del serotipo 11A, un serotipo buen formador de biofilm y asociado a resistencia antibiótica (Domenech *et al.*, 2015, Aguinagalde *et al.*, 2015). Aun así, serotipos que forman un biofilm intermedio/malo como los serotipos 3 y 8, siguen siendo de los principales causantes de ENI, siendo el serotipo 8 el más predominante en Europa y el primero en población adulta en España (de Miguel *et al.*, 2020). Los serotipos 22F y 33F también contribuyen a la ENI (Golden *et al.*, 2021, Amin-Chowdhury *et al.*, 2021), a pesar de ser malos formadores de biofilm (Domenech *et al.*, 2015). Estos resultados, sugieren que la formación

de biofilm no es el único factor a tener en cuenta cuando se pretende determinar el impacto clínico de los serotipos y su contribución en la incidencia de la ENI.

Como se había observado previamente (Domenech *et al.*, 2015), los serotipos 22F y 33F, que se encuentran colonizando y produciendo ENI y pueden ser altamente invasivos, produjeron muy poca cantidad de biofilm *in vitro*. Se determinó la capacidad de formación de biofilms en aislados clínicos de ambos serotipos, obteniendo en la mayoría de los casos un biofilm débil, en concordancia con las observaciones previas con transformantes isogénicos 22F y 33F (Domenech *et al.*, 2015). Además, este fenotipo de mal formador de biofilm no explica el aumento del 22F y 33F en la ENI. Sin embargo, teniendo en cuenta que la colonización de la nasofaringe es un proceso multifactorial y que hay numerosos factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis en la ENI, puede ser que otros factores de virulencia y no exclusivamente la formación de biofilms tengan un papel predominante en el estado de portador de los serotipos 22F y 33F (Geno *et al.*, 2015). El CPS determina la carga neta de la superficie de neumococo, y este también es un aspecto a tener en cuenta en la colonización, ya que cargas netas negativas se asocian a una mejor colonización (Weinberger *et al.*, 2009). La mayor parte de CPSs de neumococo son aniónicas y tienen una carga neta negativa (Geno *et al.*, 2015, Morais *et al.*, 2018). Esta carga anionica evita el aclaramiento de neumococo por el mucus y ayuda a repeler la fagocitosis. Como ejemplo ilustrativo, el serotipo 19A tiene una carga-negativa, es buen colonizador (Adler *et al.*, 2019), forma buen biofilm (Domenech *et al.*, 2014) y es uno de los principales serotipos VCN13 causantes de ENI (de Miguel *et al.*, 2020). Hay CPSs con carga negativa que forman buen biofilm además del 19A, como el 35B y otros que forman mal biofilm, como el 24F (Domenech *et al.*, 2015). El fenómeno de carga negativa y cómo contribuye a la colonización y a evitar el aclaramiento por el mucus podría explicar por qué el serotipo 22F es más prevalente en la población que el 33F, ya que su carga neta de superficie es negativa en el caso del serotipo 22F mientras que la del CPS 33F es neutra (Geno *et al.*, 2015). Estas diferencias podrían explicar también que el serotipo 22F sea mejor colonizador y favorezca el que se produzcan mayores tasas de enfermedad.

Respecto a la formación de biofilms en aislados clínicos, la heterogeneidad encontrada entre los diferentes aislados clínicos no es una sorpresa, ya que confirma evidencias previas sobre que el fondo genético, y no sólo el CPS, modula la adhesión

de neumococo y la formación de biofilm sobre superficies artificiales (Moscoso *et al.*, 2006, Domenech *et al.*, 2009, Domenech *et al.*, 2014). La novedad de los resultados obtenidos se correlaciona con el fenotipo diferencial encontrado entre los biofilms de aislados pediátricos y los formados por aislados de adultos, específicamente la mayor capacidad de formar biofilm de los aislados pediátricos. Estos resultados son compatibles con el hecho de que la población pediátrica es el principal portador de neumococo con una colonización asintomática del 20–40% (Chaguza *et al.*, 2020), sugiriendo que neumococo puede modular su interacción con el epitelio nasofaríngeo mediante un mecanismo relacionado con el incremento de la activación de factores intrínsecos asociados a la formación de biofilm. El origen pediátrico o adulto de la cepa no es la única diferencia entre los fenotipos de estos aislados y, aunque el genotipo no aclaró nuestros resultados (pendiente de un análisis más profundo utilizando datos de secuenciación masiva que se están analizando actualmente), otros factores no relacionados podrían estar afectando a este fenotipo.

Dentro de los aislados clínicos de serotipos 22F y 33F, se escogieron los que procedían de sangre para estudiar más a fondo sus mecanismos de patogenicidad. El crecimiento *in vitro* en neumococo es muy importante y se ha relacionado con su prevalencia en modelos murinos *in vivo* (Bättig *et al.*, 2006). Uno de los determinantes de este crecimiento *in vitro* es la producción del CPS, ya que interfiere con el crecimiento de neumococo y se ve especialmente afectado en condiciones limitantes de nutrientes (Hathaway *et al.*, 2012). Por lo tanto, uno de los determinantes del crecimiento será el serotipo capsular de *S. pneumoniae*. En nuestro caso, se incluyeron aislados de dos serotipos diferentes, pero comparando entre aislados pediátricos o adultos del mismo serotipo, por lo que el CPS no debería ser crítico en las diferencias, y ya previamente se ha observado que los aislados de neumococo pueden mostrar variaciones en las que la producción del CPS no es el factor diferencial (Tóthpál *et al.*, 2019). En esta Memoria se observó que los aislados de adultos mostraban un comportamiento diferencial respecto a los pediátricos. En concreto, el aislado 22F de adulto mostraba una fase estacionaria anormalmente larga, que podría asemejarse a lo observado en mutantes deficientes en *LytA* o en el sistema de dos componentes *CiaRH* (Moscoso *et al.*, 2010). Este fenotipo va a ser estudiado más a fondo con los datos de secuenciación masiva obtenidos y en los que se está trabajando actualmente. Aun así, este patrón anómalo de crecimiento no afectó a su virulencia ya que no se ob-

servaron diferencias respecto al aislado pediátrico ni en la evasión de la opsonofagocitosis ni en la virulencia en el modelo murino de sepsis. Por otro lado, se observó que la fase exponencial del aislado 33F adulto, empieza más tarde que el resto de aislados clínicos y su pareja pediátrica y la OD<sub>550</sub> alcanzada es menor. Esto se corresponde con una menor evasión de la opsonofagocitosis cuando crece en estado planctónico, un mayor depósito del componente C3 del complemento y una menor virulencia en el modelo animal. Estos hallazgos confirman resultados previos en los que el crecimiento *in vitro* se correlacionaba con la virulencia en un modelo animal de ratón (Bättig *et al.*, 2006, Hathaway *et al.*, 2012). Respecto a los transformantes isogénicos 22F (P244) y 33F (P017), se pudo observar un mayor crecimiento *in vitro* cuando la cepa M11 expresaba el CPS 22F que cuando expresaba el CPS 33F. El mayor impacto en virulencia del serotipo 22F también se explica por presentar una mejor evasión de la opsonofagocitosis por parte del transformante 22F, un menor depósito del componente C3 del complemento y una mayor virulencia en el modelo animal de ratón. Todo esto es consistente con los datos epidemiológicos presentados en nuestro estudio mostrando una mayor carga en la enfermedad del serotipo 22F y podría explicar por qué este serotipo también es más prevalente que el 33F en otros países (Moore *et al.*, 2015, Golden *et al.*, 2016, Ladhani *et al.*, 2018).

La resolución de la ENI depende del reconocimiento y aclaramiento de *S. pneumoniae* por fagocitos profesionales (Standish y Weiser, 2009, van der Poll y Opal, 2009). Como ya se mencionó previamente, el CPS de neumococo es el factor de virulencia más importante a la hora de estudiar la evasión de la fagocitosis, pero el fondo genético también contribuye significativamente al proceso de patogénesis (Hyams *et al.*, 2011, McAllister *et al.*, 2011). El uso de transformantes isogénicos con el mismo fondo genético es útil a la hora de realizar comparaciones ya que se evitan las diferencias observadas en cada aislado clínico (Domenech *et al.*, 2015). Para analizar la influencia del CPS en la evasión del sistema inmune, es necesario el uso de cepas con el mismo fondo genético. Nuestro estudio con los transformantes isogénicos de serotipos incluidos en la VCN13 o los que están incluidos en las nuevas vacunas VCN15 y VCN20 así como serotipos no vacunales mostró que la cepa expresando el CPS del tipo 3 era más resistente a la opsonofagocitosis que la cepa expresando la cápsula del serotipo 19A. Esto es interesante porque el serotipo 3 sigue siendo uno de los principales causantes de ENI en adultos (Moore *et al.*, 2015, Ladhani *et al.*, 2018, de

Miguel *et al.*, 2020). Esta mayor resistencia puede deberse a que la cápsula del serotipo 3 tiene un mayor tamaño y los aislados de este serotipo suelen sintetizar mayor cantidad de CPS (Choi *et al.*, 2016). Además, este serotipo tiene la capacidad de liberar CPS libre al medio interfiriendo, entre otras cosas, con la fagocitosis (Choi *et al.*, 2016). Los serotipos 8 y 11A también destacaron—ambos incluidos en la VCN20 pero también en la PPV23 y con una alta prevalencia en la ENI— en particular destacando el serotipo 8 ya que es la primera causa de ENI en adultos en España (de Miguel *et al.*, 2020). Además, ni el serotipo 8 ni el 11A fueron más resistentes a la fagocitosis al formar biofilm, pudiendo deberse a que no necesitan la ventaja que otorga esta estrategia para evadir la fagocitosis.

La formación de biofilm es un estado crítico en la patogénesis de *S. pneumoniae*. Estudios previos han identificado la presencia de biofilms en el tracto respiratorio superior (Wu *et al.*, 2017, Iverson *et al.*, 2019, Silva y Sillankorva, 2019) relacionados con la colonización nasofaríngea que es un prerrequisito para el desarrollo de ENI (Bogaert *et al.*, 2004). Es también interesante que los biofilms están implicados en infecciones activas como la meningitis, uniéndose a las células endoteliales microvasculares del cerebro y también en enfermedades respiratorias persistentes en pacientes con fibrosis quística o EPOC (Orihuela *et al.*, 2009, Vidal *et al.*, 2013, Vandeveldel *et al.*, 2014, Dennis *et al.*, 2018). En estado de biofilm, las células de *S. pneumoniae* expresan mayor cantidad de PspC, uno de los ligandos del regulador negativo del complemento factor H, y por lo tanto, degrada el C3 depositado sobre la superficie bacteriana con mayor eficiencia (Domenech *et al.*, 2013). Esta mayor expresión de PspC es interesante en términos de virulencia porque favorecen el desarrollo de ENI (Yuste *et al.*, 2010). Respecto a los transformantes isogénicos en estado de biofilm, los serotipos 3, 11A y 24F fueron los más refractarios a la fagocitosis. Los serotipos 3 y 11A son de los más frecuentes en pacientes con EPOC (Shoji *et al.*, 2018), que suelen sufrir recidivas por diferentes patógenos, entre ellos *S. pneumoniae*, y podría deberse a la formación de biofilm por estos patógenos (Weeks *et al.*, 2021). Adicionalmente, el serotipo 24F tiene tendencia a causar meningitis y producir cuadros clínicos graves (Balsells *et al.*, 2018), pudiendo preocupar esta evasión del sistema inmune incrementada cuando forma biofilm. Finalmente, en esta Tesis se confirma la mayor evasión del sistema inmune de los biofilms de *S. pneumoniae* respecto al cultivo planctónico (Domenech *et al.*, 2013), ya que se ha observado este

fenómeno por parte tanto de cepas capsuladas de diferentes serotipos como de aislados clínicos de los serotipos 22F y 33F.

El repertorio de receptores celulares involucrados en la fagocitosis de patógenos invasivos como *S. pneumoniae* y su correcto funcionamiento es crítico para el desenlace de la infección. El receptor de leucocitos PSGL-1 juega un papel importante en la defensa del hospedador frente a la infección neumocócica (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Debido al reconocimiento por PSGL-1, las células neumocócicas son fagocitadas de manera correcta y eliminadas intracelularmente, reduciendo la carga bacteriana y la diseminación en el hospedador, lo que contribuye a un mayor control en la severidad de la ENI (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Los resultados de este capítulo muestran que el receptor PSGL-1 es importante en la fagocitosis de diferentes serotipos, incluyendo los incluidos en las nuevas vacunas VCN15 y VCN20. Sin embargo, no se observó este aumento de la viabilidad en los serotipos 11A y 24F ya que, las células que expresaron PSGL-1, no eliminaron de manera eficiente estos serotipos. Esto sugiere que los CPS de ambos serotipos tendrán una capacidad incrementada de producir ENI, y concuerda con los datos que muestran una fatalidad elevada por ambos serotipos, con un 21 % el serotipo 11A y un 22.7% el serotipo 24F en la C. A. de Madrid (De Miguel *et al.*, 2021). Además, también es consistente con la emergencia de variantes resistentes a amoxicilina del serotipo 11A con el genotipo ST6521 que evaden de manera eficiente el proceso de fagocitosis y forman buen biofilm (Aguinagalde *et al.*, 2015) y con las infecciones severas que pueden llegar a causar los neumococos del serotipo 24F (Balsells *et al.*, 2018).

Los resultados de este capítulo pueden ser relevantes a la hora de entender aspectos críticos de la patogénesis de diferentes serotipos prevalentes como los cubiertos por las nuevas vacunas VCN15 y VCN20. Además, se refuerza la importancia de los estudios de vigilancia y caracterización de aislados de neumococo emergentes, para poder explicar cuáles son las posibles causas que favorecen la expansión y mayor diseminación de diferentes serotipos y genotipos.

## 2. EVOLUCIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CEFDITOREN Y OTROS ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE *S. PNEUMONIAE* EN ESPAÑA DURANTE EL PERIODO 2004–2020

El empleo de tratamientos efectivos frente a las enfermedades infecciosas ha sido uno de los mayores retos de la humanidad. Antes del descubrimiento del primer antibiótico se disponía de pocas armas para combatir a los agentes infecciosos, siendo la utilización de terapias basadas en anticuerpos una de las primeras estrategias (Casadevall, 1996). La sueroterapia se utilizó frente a numerosas infecciones, incluyendo las producidas por *S. pneumoniae* (Casadevall y Scharff, 1995), consiguiendo reducir hasta en un 50% la mortalidad de la infección (Casadevall y Scharff, 1994). Sin embargo, la clave de la lucha frente a la enfermedad neumocócica fue la quimioterapia antibiótica, que surgió en la década de los 30 del pasado siglo, desapareciendo la sueroterapia. Sin embargo, la efectividad de esta quimioterapia antibiótica se vio mermada por la aparición de aislados clínicos resistentes, surgiendo de hecho, al poco tiempo del uso generalizado de antibióticos (Spagnolo *et al.*, 2021). En el caso de *S. pneumoniae*, el uso de estrategias profilácticas basadas en la inmunización parece ser la mejor medida para el control del desarrollo de la ENI y neumonía, además de reducir el impacto de la resistencia a antibióticos (Lipsitch y Siber, 2016, Atkins *et al.*, 2018). Aunque el uso de los antibióticos disponibles es la opción preferente para tratar las infecciones neumocócicas una vez están establecidas, la aparición de cepas multirresistentes puede agravar el desenlace de la infección, en muchos casos (Ardanuy *et al.*, 2014, Aguinagalde *et al.*, 2015, Azarian *et al.*, 2018).

La prevalencia de la resistencia a antibióticos en *S. pneumoniae* aumentó globalmente en la era preVCN y, a pesar de las vacunas actuales, el aumento de serotipos asociados a resistencia a antibióticos es un fenómeno preocupante (Fenoll *et al.*, 2009, Aguinagalde *et al.*, 2015, Cassiolato *et al.*, 2018). Estos patrones de resistencia frente a los antibióticos varían dependiendo del serotipo y las regiones geográficas, ya que varios factores pueden influir en la aparición y aumento de cepas resistentes entre los que se encuentran: ratios de vacunación bajos, el fenómeno de reemplazo de serotipos por serotipos no vacunales y el uso inadecuado de antibióticos (Reinert, 2009, Song *et al.*, 2012, Chávez *et al.*, 2021).

En este capítulo se investigaron los patrones de resistencia de *S. pneumoniae* a una amplia variedad de antibióticos incluyendo penicilinas, cefalosporinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Además, se analizaron estos patrones de resistencia según el origen del aislado y se observó la evolución según serotipos incluidos en vacunas conjugadas o no. Uno de los mayores problemas del patógeno *S. pneumoniae* es la aparición de cepas resistentes a penicilina que contienen mutaciones en las PBPs, disminuyendo la actividad intrínseca de muchos  $\beta$ -lactámicos incluyendo penicilinas y cefalosporinas (Nagai *et al.*, 2002). Como se comentó en Resultados, el cefditoren fue el antibiótico con la mayor proporción de aislados susceptibles (con más del 80% de los aislados susceptibles a este antimicrobiano durante el periodo estudiado). Ya previamente se había demostrado que esta cefalosporina mantiene una buena actividad frente a cepas no susceptibles a penicilina debido a una gran afinidad por la PBP2x, por lo que su actividad antimicrobiana se ve aumentada y por eso se observaron valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> bajos y estables (0.5 y 1  $\mu$ g/ml en los aislados clínicos analizados en esta Tesis Doctoral) (Yamada *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2012). Analizando los 16 años que abarca el estudio, se confirmó que el cefditoren fue la cefalosporina oral con las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> más bajas, desde su introducción en 2004 y a pesar de su amplio uso en la práctica clínica, la aparición de cepas no susceptibles a este antibiótico es muy baja. En cambio, la cefixima y cefpodoxima, dos cefalosporinas orales de tercera generación, fueron de los antibióticos con menor proporción de cepas susceptibles durante el periodo de estudio.

De todos los antibióticos analizados en los 16 años del estudio, el cefditoren seguido de cefotaxima fueron los fármacos con mayor actividad antimicrobiana, independientemente del origen del aislado clínico. Esto es importante a la hora de tratar una infección neumocócica, ya que el cefditoren está indicado en el tratamiento de la neumonía adquirida en comunidad (Granizo *et al.*, 2006, Di Marco *et al.*, 2014) y puede ser usado como tratamiento oral tras la administración parental de cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima o ceftriaxona (Monmaturapoj *et al.*, 2012). Esto también resulta interesante porque se ha demostrado que un cambio temprano de terapia intravenosa a terapia oral de antibióticos en pacientes con neumonía severa adquirida en comunidad, es más seguro y disminuye el tiempo de hospitalización (Mandell *et al.*, 2007), y es recomendado por diferentes organismos como la *Infectious Diseases society of America* (IDSA) y la *American Thoracic Society* (ATS). En este sentido, el cefditoren ha sido el candidato recomendado como la opción más

adecuada en este cambio temprano de terapia intravenosa con cefalosporinas de tercera generación a terapia oral, ya que tiene un espectro de acción similar y la actividad intrínseca es mayor (Blasi *et al.*, 2016). Este cambio no sólo va a beneficiar al paciente, sino que va a tener implicaciones económicas en los sistemas de salud ya que no sólo reduce el tiempo y el coste de hospitalizaciones, sino que reduce el riesgo de adquirir infecciones intrahospitalarias, uno de los mayores problemas sanitarios hoy en día.

Es interesante tener en cuenta que la manera de interactuar de los antibióticos con la bacteria *in vivo* es más compleja que cuando se ensayan en condiciones *in vitro*, debido a la presencia de las proteínas séricas. Previamente, se ha demostrado que la actividad del cefditoren a concentraciones fisiológicas y bajo condiciones de unión a proteínas similares a las encontradas en humanos, no se veía afectada, sugiriendo que, en modelos *in vivo*, no se debilitaba la actividad antineumocócica de esta cefalosporina (Sevillano *et al.*, 2007, Sevillano *et al.*, 2008). Posteriormente, se demostró que concentraciones subinhibitorias de cefditoren en presencia de sueros hiperinmunes (que contenían anticuerpos específicos frente a cepas resistentes a antibióticos) estimulaban la inmunidad mediada por el sistema del complemento (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). Este efecto está relacionado con un aumento del depósito de C1q y reconocimiento por la pentraxina CRP, que tiene consecuencias funcionales en términos de opsonización por el componente C3b. Además, estos hallazgos explican por qué también se veía aumentada la fagocitosis en presencia de suero y concentraciones subinhibitorias de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). Este efecto inmunomodulador producido por ciertos antibióticos, que provoca un aumento de la respuesta inmune del hospedador, es una estrategia alternativa y prometedora a la hora de luchar frente a cepas multirresistentes en la práctica clínica (Domenech *et al.*, 2018).

Otro aspecto de interés del estudio consistió en evaluar el impacto de la vacunación en la evolución de aislados de neumococo con susceptibilidad reducida a los diferentes antibióticos. Las medidas preventivas frente a la infección producida por *S. pneumoniae* han modificado las resistencias de este patógeno. La VCN7, que incluía los CPS de los principales serotipos responsables de ENI y tenían la mayor carga de aislados no susceptibles a penicilina, eritromicina o ambos, se licenció a principios del presente siglo para la inmunización de la población infantil. El uso generalizado

de esta vacuna conjugada llevó a una disminución drástica de la incidencia de la ENI causada por los serotipos vacunales y redujo la prevalencia creciente de serotipos de neumococo no susceptibles a PEN. Además, el uso de esta vacuna en la población pediátrica hizo que la población adulta se beneficiara también, teniendo un efecto en la epidemiología de los aislados clínicos de adulto (Fenoll *et al.*, 2009). A pesar de que la introducción de estas vacunas conjugadas redujo claramente los casos de ENI por los serotipos vacunales y ayudó a controlar la diseminación de cepas multirresistentes, muchos países han notificado el fenómeno de reemplazo de serotipos incluyendo serotipos asociados a multirresistencia (Ladhani *et al.*, 2018, Cassiolato *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020, Ouldali *et al.*, 2021). De todos los antibióticos del estudio, el aumento de serotipos no-VCN13 asociados a susceptibilidad reducida (I/R) en el periodo estudiado fue mucho menor en el caso del cefditoren (<13%). Esto es importante epidemiológicamente y en la práctica clínica. Sin embargo, resulta preocupante que la mayoría de antibióticos estudiados incluyendo cepas multirresistentes con baja susceptibilidad tanto a PEN como a ERY, haya una carga de enfermedad ascendente producida por serotipos no vacunales. Esta mayor incidencia de ENI por serotipos que no están cubiertos por la VCN13 se conseguirá paliar con la llegada de las nuevas vacunas conjugadas de espectro más amplio como la VCN15 y VCN20 (Stacey *et al.*, 2019, Hurley *et al.*, 2020), pero al igual que sus predecesoras tendrá el inconveniente de la cantidad limitada de serotipos que cubren y su efectividad se podrá ver amenazada, una vez más, por el reemplazo de serotipos (Weinberger *et al.*, 2011).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DE *S. AUREUS* SENSIBLE/RESISTENTE A METICILINA

Durante esta Tesis se ha resaltado la importancia clínica de *S. aureus*. Aunque este patógeno pueda causar infecciones en el ámbito comunitario y tanto en niños como adultos previamente sanos, es un patógeno realmente importante en el ámbito de las infecciones intrahospitalarias. Estas infecciones son las adquiridas por el paciente durante el ingreso en una institución sanitaria y puede deberse a múltiples causas como complicaciones postquirúrgicas, transmisión entre pacientes y sanitarios, dispositivos médicos implantados, etc. Estas infecciones adquiridas en el hospital suponen más de 2,5 millones de casos anuales en Europa (Cassini *et al.*, 2016) y es uno de los principales problemas sanitarios de España, siendo los estafilococos los principales causantes de bacteriemias e infecciones quirúrgicas en los últimos años (RENAVE, 2021).

En el caso de las infecciones producidas por *S. aureus*, estas patologías se agravan cuando los aislados son SARM, uno de los principales culpables de los brotes intrahospitalarios en el mundo (Chambers y Deleo, 2009), aunque también se asocian con infecciones adquiridas en la comunidad (Faoagali *et al.*, 1992, Fridkin *et al.*, 2005) y relacionadas con el ganado (Voss *et al.*, 2005). Uno de los principales problemas de estos aislados SARM es su capacidad para adquirir resistencia a muchos otros antibióticos alternativos, por lo que el tratamiento de la infección se complica notablemente (Rodvold y McConeghy, 2014, Stryjewski y Corey, 2014). Un aspecto destacable en *S. aureus* es su gran adaptación al huésped y la posibilidad de adquirir mecanismos de resistencia a los nuevos antimicrobianos, lo que obliga a que sea necesario establecer sistemas eficaces de vigilancia de la resistencia frente a los diferentes antimicrobianos.

Al comparar los datos de los aislados de *S. aureus* recibidos en el LIH del CNM con los datos del estudio RENAVE se pudo observar que la proporción de aislados de *S. aureus* de origen comunitario notificados al estudio RENAVE es mayor (56–57% de aislados comunitarios vs. 42–24% de aislados intrahospitalarios) en los años 2018 y 2019 que la proporción en los aislados recibidos en el LIH del CNM (37–40% de aislados comunitarios vs. 60–62% de aislados intrahospitalarios). Estos resultados con-

afirman la importancia clínica de *S. aureus* y otros estafilococos asociados a infecciones intrahospitalarias. Esta variación también se observó con aislados SASM o SARM, ya que la proporción publicada en la red RENAVE indica una mayoría de aislados SASM intrahospitalarios (64%), si se comparan con los aislados caracterizados en el CNM donde se recibieron una proporción bastante similar de aislados SASM (50–58%) y SARM (42–50%). Una posible explicación a esta diferencia entre los datos de la red RENAVE y los aislados caracterizados en el CNM sería que las cepas enviadas al CNM suelen ser de pacientes con las patologías más graves y, por tanto, asociadas a una mayor expresión de toxinas y factores de virulencia que son aspectos que no suelen caracterizarse en los hospitales de origen.

En los datos procedentes del último estudio RENAVE de infecciones intrahospitalarias (RENAVE, 2021), los aislados de *S. aureus* procedían según planta o unidad asistencial: 1º quirúrgica, 2º médica, 3º mixta y 4º cuidados intensivos (UCI). Esto último podría explicar por qué el impacto de la pandemia producida por SARS-CoV-2 no ha sido tan grande en el número de aislados clínicos recibidos, ya que este patógeno sigue siendo relevante en las infecciones intrahospitalarias y las hospitalizaciones y uso de UCIs en 2020 se intensificó debido al SARS-CoV-2 (Pollán *et al.*, 2020).

Respecto a la situación mundial, las cepas SARM son muy prevalentes en los hospitales en casi todos los países (Stefani *et al.*, 2012). Aunque muchas veces los datos epidemiológicos difieren según el diseño y tipo de estudio y la muestra de población, se han observado mayores proporciones de SARM asociado a hospitales (SARM-AH) (>50%) en América del Norte y América del Sur, algunos países asiáticos y Malta (Mejía *et al.*, 2010, Song *et al.*, 2011, Stefani *et al.*, 2012). En China, Australia, África y algunos países europeos es frecuente encontrar una situación intermedia (25–50%) como, por ejemplo, en Portugal (49%), Grecia (40%) o Italia (37%) (Grundmann *et al.*, 2010, Stefani *et al.*, 2012). En esta última situación se encontraría España, con aproximadamente un 30% de aislados SARM dentro de los aislados intrahospitalarios, si se tiene en cuenta los datos del estudio RENAVE. Considerando los aislados recibidos en el CNM, la situación de España sería más parecida a la de Portugal y Grecia, con, aproximadamente, el 40–49% de aislados SARM procedentes del ámbito hospitalario.

Además de la existencia o no de resistencia a antibióticos, uno de los principales problemas con los estafilococos y, en especial, con *S. aureus* es la formación de biofilms. *S. aureus* es un patógeno oportunista que puede producir biofilms robustos tanto en superficies bióticas como abióticas. Uno de los factores principales de la patogénesis de *S. aureus* es el cambio de estado planctónico a biofilm para causar diferentes enfermedades como endocarditis, osteomielitis e infecciones en prótesis (Vestby *et al.*, 2020, Schilcher y Horswill, 2020). Entre los principales problemas asociados a estos biofilms destacan una elevada evasión del sistema inmune y una mayor resistencia a los antibióticos debido, seguramente, a la baja actividad metabólica dentro del biofilm y a la existencia de células persistentes (Hogan y Kolter, 2002, Schilcher y Horswill, 2020).

La regulación y composición del biofilm de *S. aureus* son complejos; los procesos de formación y disgregación del biofilm están controlados de forma sutil por diferentes sistemas de regulación que dependen de la fisiología de la célula, factores ambientales y dinámicos dentro del propio biofilm (Schilcher y Horswill, 2020). Además, esta regulación también depende de la composición del biofilm. En este sentido, es común encontrar biofilms que son más dependientes de polisacárido y que, por tanto, tendrán como componente clave el exopolisacárido PIA o PNAG (*ica*-dependientes) que está regulado por el operón *ica* (Cramton *et al.*, 1999) y su regulador principal, el represor IcaR (Jefferson *et al.*, 2004). También existen biofilms basados de forma mayoritaria en componentes proteicos (*ica*-independientes) que están más asociados a aislados SARM, siendo la proteína de superficie Bap su principal componente (Cucarella *et al.*, 2001, Cucarella *et al.*, 2004), pudiendo formar estructuras amiloides que promueven la formación de biofilm (Taglialegna *et al.*, 2016). Por último, se ha observado recientemente la importancia del ADN<sub>e</sub> en la formación del biofilm estafilocócico (Sugimoto *et al.*, 2018), denominando incluso un último grupo de biofilms en las que sus EPS se basan mayoritariamente en ADN. Además, el ADN<sub>e</sub> parece importante a la hora de mantener los biofilms estafilocócicos maduros, demostrando su importancia como componente estructural de los mismos (Mann *et al.*, 2009). Se ha observado que el ADN<sub>e</sub> puede interaccionar mediante cargas electrostáticas con proteínas celulares produciendo un efecto de *moonlight* (un efecto de protección mediante recubrimiento) en la matriz del biofilm (Kavanaugh *et al.*, 2019). Dentro de estas proteínas se observó que factores de virulencia secretados y proteínas ribosomales están atrapadas en la matriz del biofilm contribuyendo a su estabilización (Graf

*et al.*, 2019). Este fue uno de los objetos de estudio de esta Memoria ya que, entre los factores de virulencia detectados, estaban las leucotoxinas (Graf *et al.*, 2019). En esta Tesis se realizó un análisis de diferentes cepas en las que se estudió la capacidad de formación de biofilm de diversos aislados clínicos que expresaban distintas toxinas como ETA, ETB, PVL y TSST aunque no se observó un patrón claro. Nuestros resultados mostraron que todos los aislados que producían la leucotoxina PVL formaron buen biofilm, lo que podría deberse a un efecto de *moonlight* por este factor de virulencia lo que ayudaría a estabilizar el biofilm maduro y, por tanto, se correspondería a lo descrito por Graf y colaboradores (Graf *et al.*, 2019). A pesar de estas evidencias observadas, nuestro estudio tiene la limitación de tener un número pequeño de aislados clínicos estudiados que presentasen esta toxina. Otro aspecto llamativo observado fue el patrón bimodal de buena o mala formación de biofilm de los aislados SASM y SARM capaces de producir ETA, por lo que se decidió estudiar más a fondo las matrices de estos biofilms, aspecto que se discutirá más adelante.

Se evaluó la posible asociación entre la formación de biofilm y el serotipo capsular, ya que, como se ha comentado anteriormente, en otros microorganismos como *S. pneumoniae* no todos los serotipos tiene la misma capacidad de formar biofilm (Domenech *et al.*, 2014, Domenech *et al.*, 2015) y, además, varios estudios han mostrado una asociación entre tipo de cápsula y cantidad de biofilm formado (Bardiau *et al.*, 2014, Salimena *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos muestran que el 77% de los aislados clínicos del serotipo 5 y el 64% de los aislados de serotipo 8 formaron buen o muy buen biofilm ( $A_{595} \geq 3$  y  $A_{595} \geq 3.5$ ). Estos resultados se corresponden con hallazgos previamente observados por otros autores que mostraban que los aislados de serotipo 8 contenían mayor número de malos formadores de biofilm y que los aislados de serotipo 5 tendían a producir mayor biofilm (Bardiau *et al.*, 2014, Salimena *et al.*, 2016). Aun así, es difícil asociar un fenotipo a la cápsula de *S. aureus*, ya que su expresión va a depender de las condiciones ambientales a las que estén sometidas las cepas. En este sentido, se ha visto que aislados de los serotipos 5 y 8 de *S. aureus* en cultivo líquido con condiciones aerobias o crecidos en placas de cultivo sí que suelen expresar cápsula (O'Riordan y Lee, 2004). Por ello, a veces, es frecuente encontrar estas variaciones en los resultados que intentan dilucidar la influencia de la cápsula en diferentes fenotipos como el biofilm (Salimena *et al.*, 2016). Otro aspecto que también podría afectar es la sensibilidad antibiótica, ya que también se ha asociado la resistencia a metilina con la capacidad de las cepas para formar biofilm.

En aislados clínicos SARM se notó una asociación positiva entre cantidad de biofilm producido, cantidades de PBP2a en la superficie bacteriana, valores de CMI a la meticilina y expresión del gen *mecA* (Côrtes *et al.*, 2015). Además, en una cepa de *S. aureus* negativa en el gen *mecA* se sobreexpresó la PBP2a, reprimiendo el regulador negativo de biofilm *agr*, lo que favoreció la formación de biofilm (Pozzi *et al.*, 2012). Durante esta Tesis no se han observado diferencias entre las cepas buenas formadoras de biofilm SASM y SARM, pero sí que se apreció una mayor proporción de aislados buenos formadores de biofilm SARM, correspondiéndose a lo observado previamente (Côrtes *et al.*, 2015), aunque también hay que tener en cuenta que la mayoría de aislados SARM eran serotipo 5 y SASM serotipo 8, lo que podría contribuir a este fenotipo a nivel de formación de biofilm.

Como se ha explicado en la Memoria, se decidió estudiar más a fondo las matrices de los biofilms de los aislados productores de toxina ETA que presentaban un patrón bimodal. Los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos sugieren que las matrices de los aislados clínicos seleccionados son más complejas de lo que podría parecer en un principio. En ningún momento, tras los experimentos de disgregación, se pudo encontrar un patrón en el efecto de la proteinasa K y DNasal en los biofilms, lo que explicaría que su composición principal son proteínas y ADNe (*ica*-independientes) y biofilms que se vieran afectados sólo por el NaIO<sub>4</sub> lo que supondría que estarían compuestos principalmente de exopolisacáridos (*ica*-dependientes). Los resultados mostraron que en todos los aislados de *S. aureus* estudiados, la matriz se veía afectada por las diferentes enzimas y compuestos lo que indica la importancia del componente proteico, del ADNe y del exopolisacárido en el mantenimiento de los biofilms maduros. La disgregación del componente proteico por la proteinasa K es inespecífica ya que escinde enlaces de aminoácidos alifáticos, aromáticos e hidrofóbicos. Al igual que en esta Tesis, se ha observado previamente que los biofilms de aislados clínicos pueden ser susceptibles a más de una enzima, ya que la integridad estructural de los biofilms se mantiene por diversas moléculas (Sugimoto *et al.*, 2018). La redundancia de mecanismos que existen para la formación del biofilm en este patógeno hace que sea difícil distinguir los procesos involucrados en esta formación (Zapotoczna *et al.*, 2016).

En todos los aislados clínicos estudiados en esta Tesis se confirmó que la proteínasa K fue activa en el proceso de disgregación del biofilm, demostrando que el componente proteico juega un papel clave en su mantenimiento. En la inhibición del biofilm, afectó a todos los aislados clínicos menos al considerado como mal formador de biofilm (62822/15) en el que solo se vio efecto con la concentración 25 µg/ml. Se podría, por tanto, afirmar que las proteínas extracelulares también son importantes en el desarrollo del biofilm en general. Aunque el componente proteico principal de los biofilms de *S. aureus* es la proteína Bap (Cucarella *et al.*, 2001), es importante destacar que existen otras proteínas con un papel tanto en la adhesión inicial como en la acumulación del biofilm (Schilcher y Horswill, 2020). Por ejemplo, las proteínas FnBPA, FnBPB y SdrC, ayudan a la adhesión inicial y promueven las interacciones célula-célula en el biofilm, aumentando su formación (Figueiredo *et al.*, 2017, Schilcher y Horswill, 2020). Además, SasG también promueve la formación de biofilm mediante dimerización mediada por zinc (Geoghegan *et al.*, 2010).

El estudio del ADN extracelular en la formación y mantenimiento del biofilm con los diferentes aislados clínicos permitió diferenciar entre aislados que eran buenos formadores de biofilm de los considerados como malos formadores de biofilm. La presencia de ADNe en todos los aislados no es extraña, ya que se ha observado previamente que este es uno de los componentes principales de los EPS en la mayoría de biofilms cuantiosos de *S. aureus*, independientemente de si se tratan de aislados *ica*-dependiente o *ica*-independiente, aunque los aislados *ica*-dependiente tendrían menor cantidad de ADNe (Sugimoto *et al.*, 2018). También se han descrito casos en los que se mostraba una mayor resistencia al tratamiento por DNasal en aquellos aislados *ica*-dependientes (Houston *et al.*, 2011). En esta Memoria, se observó que la DNasal disgregaba los biofilms de todos los aislados a las 23 h de formación, lo que demostraba la importancia del ADNe para el mantenimiento, y confirmaba hallazgos previos por otros autores que mostraban que el ADN juega un papel central en el mantenimiento del biofilm maduro de estafilococo (Mann *et al.*, 2009, Sugimoto *et al.*, 2018). La importancia del ADNe en el desarrollo del biofilm de *S. aureus* se observó en aquellos aislados clínicos clasificados como buenos formadores de biofilm a las 24 h ( $A_{595} \geq 3$ ), en cambio, en el resto de aislados clínicos no se observó un efecto significativo. Sugimoto y colaboradores, demostraron que el ADNe es muy importante para formar un buen biofilm (Sugimoto *et al.*, 2018).

La presencia de exopolisacáridos se analizó mediante tratamiento con  $\text{NaIO}_4$ , que es un compuesto que se ha utilizado previamente para detectar componentes polisacáridicos en los biofilms bacterianos (Stevens *et al.*, 2009, Domenech *et al.*, 2013a, Domenech *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos mostraron que todos los aislados fueron susceptibles al tratamiento con este compuesto lo que indicaba la presencia de, al menos, un exopolisacárido en la matriz del biofilm, aunque no se pudo confirmar si se trataba de PNAG o PIA ya que este compuesto no permite su diferenciación. Para abordar este aspecto, se podría utilizar la enzima dispersina B producida por la bacteria oral Gram-negativa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que degrada específicamente este poli- $\beta$ -1,6-GlcNAc (Ramasubbu *et al.*, 2005, Izano *et al.*, 2008). Una de las limitaciones de esta Memoria es que no disponíamos de esta proteína así que no se pudieron realizar los ensayos pertinentes para confirmar si estos exopolisacáridos degradados por el  $\text{NaIO}_4$  eran PIA o no. Tampoco se realizó caracterización mediante el anticuerpo policlonal anti-PIA por no disponer del mismo (Joyce *et al.*, 2003).

En las inhibiciones y disgregaciones de los biofilms de *S. aureus* se observaron diferencias por primera vez en el patrón de biofilm formado cuando estos se incubaban 23 h y se trataban una hora más, en comparación a cuando se incubaban 24 h. Los resultados mostraron que aislados clínicos que eran malos formadores de biofilm (a las 24 h), a las 23 h, tenían una mayor biomasa. Por ello, al estudiar aislados SASM y SARM buenos y malos formadores de biofilm se pudo observar que los aislados considerados como malos formadores de biofilm a las 24 h tenían diferentes patrones de biofilm según evolucionaba el biofilm, encontrando picos de buena formación de biofilm (16–19 h y 23 h) y valles de mala formación de biofilm (20 h y 24 h). Estas diferencias tan evidentes en tan poco tiempo son llamativas, y podrían estar asociadas a que los biofilms entrasen en la llamada fase de éxodo previa a la maduración final y la fase de dispersión final como han descrito otros autores (Moormeier *et al.*, 2014). Ya previamente se había descrito la fluctuación en biofilms de *S. aureus* en flujo continuo, donde se describió una fase de éxodo previa a las fases de biofilm maduro y dispersión (Moormeier *et al.*, 2014), pero no se ha descrito previamente este fenómeno en biofilms estáticos. Esta fase de éxodo es un proceso independiente a la fase de dispersión del biofilm maduro, que está regulada por el sistema de QS Agr que, a su vez, depende de la acumulación del péptido autoinductor (Yarwood *et al.*, 2004) e inducirá a una mayor actividad de las proteasas (Boles y Horswill, 2008),

una mayor regulación de factores transcripcionales (Mootz *et al.*, 2015) y a la producción de modulinas solubles en fenol (Periasamy *et al.*, 2012). Este éxodo está producido por la actuación de la nucleasa, Nuc, producida por la propia bacteria que degradará el ADNe de la matriz y reducirá la biomasa total del biofilm, fenómeno que se había observado previamente (Mann *et al.*, 2009, Kiedrowski *et al.*, 2011). Además, está regulado de forma sutil durante el desarrollo del biofilm y sólo subpoblaciones de las células en el biofilm expresaban *nuc* lo que resultaba en una liberación de células de esas zonas por la degradación del ADNe por la nucleasa (Moormeier *et al.*, 2014). Este proceso complejo podría explicar el fenómeno observado en los aislados considerados como malos formadores de biofilm aunque metodológicamente hay diferencias, ya que Moormeier y colaboradores lo observaron en biofilms de flujo continuo y, en esta Tesis, se realizaron biofilms estáticos en placas multipocillo. Además, el hecho de que este fenómeno de dispersión esté mediado por Nuc que degrada la matriz, podría explicar por qué al tratar un biofilm de 23 h con DNasal en los aislados formadores de biofilm se observaba un efecto de dispersión pero, al tratar los biofilms a las 20 h y 24 h, en ninguno de los dos casos la matriz se veía afectada por la DNasal. Estos resultados podrían sugerir que en la matriz del biofilm hay un componente de ADNe a las 23 h que se degrada a las 24 h produciendo una alteración en su estructura en determinadas zonas del biofilm y una disminución de la biomasa observada. El marcaje con la lectina WGA, permitió observar claramente que a las 16 h y 23 h había mucha mayor cantidad de exopolisacárido que a las 20 h y 24 h, donde había acúmulos de la lectina, pero apenas estaba el biofilm recubierto de polisacárido. Esta reestructuración de la matriz observada mediante CLSM, y que afecta al exopolisacárido, podría deberse a este mecanismo de desprendimiento de la matriz por degradación de ADNe por parte de Nuc, ya que el ADNe es un componente esencial en el mantenimiento de la estructura del biofilm (Mann *et al.*, 2009). Se intentó visualizar el ADNe también por CLSM usando DDAO, ya que, por sus propiedades, era factible observarlo de forma sencilla (Domenech *et al.*, 2016). Sin embargo, no se consiguió marcar el ADNe con este compuesto. En un futuro sería interesante realizar otras aproximaciones basadas en la utilización de otros fluorocromos afines a ADNe como TOTO-1 y DAPI (Zatorska *et al.*, 2017, Graf *et al.*, 2019) o un marcaje con anticuerpos monoclonales anti ds-DNA (Domenech *et al.*, 2016). Por último, este fenómeno de dispersión observado en los aislados malos formadores de biofilm también puede recordar a las “olas” de disgregación y recrecimiento mostradas en el aislado USA300 WT después de 72 h de incubación en un sistema de flujo

continuo (Yarwood *et al.*, 2004). Este fenómeno que suele apreciarse en fases de incubación muy largas, se debe a la expresión de las modulinas solubles en fenol, reguladas por *agr*, que tienen una implicación en la estructuración (formación de canales, superficies irregulares) y en la expansión y dispersión del biofilm (Periasamy *et al.*, 2012). En nuestro caso, los tiempos estudiados fueron más cortos, pero al tratarse de aislados clínicos distintos y un sistema de biofilm estático, estas desestructuraciones con pérdidas de biomasa y recuperaciones podría deberse a este fenómeno y no a los fenómenos de éxodo antes explicados.

El último objetivo del presente capítulo consistió en estudiar los mecanismos de evasión del sistema inmune por parte de *S. aureus*. Una de las primeras líneas de lucha que tiene nuestro sistema inmune frente a este patógeno es la fagocitosis por parte de neutrófilos y otros fagocitos profesionales. *S. aureus* tiene diversos mecanismos para evitar esta fagocitosis siendo uno de ellos la producción de cápsula, que evade la opsonofagocitosis impidiendo el depósito de complemento o unión de anticuerpos específicos (O'Riordan y Lee, 2004). Esta bacteria tiene además, diversos factores de virulencia que impiden la activación del sistema del complemento y la fagocitosis como son: la metaloproteasa; el inhibidor estafilocócico del complemento o Efb; la proteína Eap, que evita la extravasación del neutrófilo; SpA, Sbi y SSL10 que bloquean la fagocitosis mediada por los receptores FcR y otros muchos (Lee *et al.*, 2004, Rooijackers *et al.*, 2005, Atkins *et al.*, 2008, Patel *et al.*, 2010, Laarman *et al.*, 2011, Woehl *et al.*, 2014, Becker *et al.*, 2014). El receptor de neutrófilos PSGL-1, que tiene una función principal de extravasación, también ha demostrado ser un receptor de leucocitos que participa en el reconocimiento y aclaramiento de patógenos invasivos como *S. pneumoniae* (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Al realizar una aproximación experimental similar con aislados de *S. aureus* en estado planctónico de distintos orígenes, expresando diferentes cápsulas y factores de virulencia no se observó una implicación del receptor PSGL-1 en el reconocimiento de este patógeno. Estos resultados confirman que el PSGL-1 no parece reconocer ninguna de estas estructuras como reconoce algunos CPS de neumococo y su autolisina LytA.

Por otro lado, ya se ha comentado previamente que una de las principales ventajas de los biofilms es su evasión del sistema inmune. Se han observado diversos mecanismos de evasión del sistema inmune en *S. aureus*. Uno de los más estudiados radica en que el biofilm enmascara los patrones moleculares de reconocimiento a

patógenos (PAMPs) evitando así su reconocimiento (Scherr *et al.*, 2014). También es capaz de impedir la entrada de los fagocitos y su función normal, aunque ya se observó que había casos en los que estos fagocitos sí que podían adherirse y penetrar en el biofilm (Leid *et al.*, 2002). Un aspecto que también es importante, consiste en que las bacterias formando biofilm son capaces de dirigir la respuesta inmune hacia rutas antiinflamatorias induciendo respuestas que favorezcan la persistencia bacteriana (Scherr *et al.*, 2014), pudiendo llegar a interferir con la polarización de macrófagos M1 o la expresión de citoquinas y mediadores proinflamatorios (Thurlow *et al.*, 2011, Hanke *et al.*, 2013, Scherr *et al.*, 2014). Previamente, en esta Memoria se ha explicado como los biofilms de *S. pneumoniae* son capaces de evadir la opsonofagocitosis evitando el depósito de componentes del complemento —como C3— y reclutando reguladores negativos —como el factor H— (Domenech *et al.*, 2013b). En esta Tesis se estudió si este mecanismo observado en neumococo también era aplicable a *S. aureus*. Para ello, se siguió una metodología similar llevando en paralelo un cultivo planctónico con un biofilm *in vitro* de un aislado SASM y un aislado SARM, realizando ensayos de opsonofagocitosis y depósito de C3 para comparar cultivos en estado biofilm vs. planctónico. Los resultados obtenidos mostraron que, *S. aureus* en forma de biofilm evade la fagocitosis más eficazmente que en estado planctónico, pero a diferencia de neumococo, la evasión de la fagocitosis por parte de los biofilms de *S. aureus* es independiente del complemento. Esta supervivencia aumentada del biofilm respecto al planctónico se mantenía en ausencia de suero sugiriendo que en *S. aureus*, la evasión de la fagocitosis es un mecanismo mucho más eficiente que en neumococo.

#### 4. BIOFILMS MIXTOS DE *S. AUREUS* Y *S. PNEUMONIAE*

Como se explicó en la introducción de esta Memoria, las bacterias que persiguen la estrategia de formar un biofilm tienen mecanismos que favorecen la diversidad microbiana (Wolcott *et al.*, 2013). Estos potenciales biofilms polimicrobianos tienen una rica pluralidad genómica, que puede facilitar las infecciones persistentes (Ehrlich *et al.*, 2005). Además, el contacto estrecho entre sus integrantes que facilita el biofilm, contribuye al intercambio de genes de virulencia y resistencia, incrementado la importancia de los biofilms en la práctica clínica (Schilcher y Horswill, 2020, Domenech *et al.*, 2013, Domenech *et al.*, 2012, Bair y Campagnari, 2019). En 2004, Cryer y colaboradores demostraron la existencia de biofilms de *P. aeruginosa* en la mucosa sinusal de pacientes con rinosinusitis crónica recalcitrante. Posteriormente, se ha demostrado la existencia de infecciones mixtas relacionadas con el estado de biofilm como otitis, rinitis y sinusitis entre patógenos como *S. aureus*, *S. pneumoniae* y otros (Brook, 2016, Welp y Bomberger, 2020, Davcheva-Chakar *et al.*, 2015, Hamilos, 2019). Todas estas evidencias ponen de manifiesto que la existencia de biofilms polimicrobianos de patógenos relevantes en la práctica clínica como *S. aureus* y *S. pneumoniae* es un fenómeno frecuente, además de preocupante, desde la perspectiva de las enfermedades infecciosas.

Tradicionalmente, *S. aureus* y *S. pneumoniae* se han visto como especies excluyentes, ya que diferentes estudios mostraron una asociación negativa en la colonización de *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Regev-Yochay *et al.*, 2004, Spijkerman *et al.*, 2012, Chien *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2013). Además, algunos de estos estudios parecían indicar que la colonización por serotipos neumocócicos vacunales VCN7 impedía la colonización por *S. aureus*. El mecanismo descrito de esta asociación negativa se debía a la muerte de *S. aureus* por el peróxido de hidrógeno producido por *S. pneumoniae*. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no era lo que se requería para producir dicha muerte (Khan *et al.*, 2016). Estudios *in vitro* indicaron que la muerte de *S. aureus* se producía por radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que se formaban en presencia de neumococo (Wu *et al.*, 2019). Estos radicales hidroxilo inducen la degradación del ADN de *S. aureus*, produciendo su intoxicación y muerte. Este fenómeno se produce cuando la proporción de *S. pneumoniae* es mayor que la de *S. aureus*, ya que, al inocular cantidades similares, *S. aureus* sobrevive cuando se enfrenta a la población de *S. pneumoniae* (Wu *et al.*, 2019). En el estudio descrito

en la Tesis, usamos proporciones SASM/SARM: *Sp* 1:1 y 1:11, donde la cantidad de *S. pneumoniae* era once veces mayor que la de *S. aureus*, y no se observó esta relación negativa.

Por otro lado, hay estudios epidemiológicos que no han observado esta asociación, y algunos muestran que hasta el 24% de los pacientes están colonizados por ambas especies (Quintero *et al.*, 2011, Ebruke *et al.*, 2016, Melles *et al.*, 2007), por lo que esta colonización exclusiva no se observó. Además, hay estudios que han analizado cómo afectaban la vacuna conjugada antineumocócica y los serotipos VCN7 en la colonización de *S. aureus*, demostrando que la vacunación no modifica la colonización nasofaríngea de *S. aureus* (Cohen *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009). Estudios con modelos animales han demostrado que *S. aureus* y *S. pneumoniae* pueden cohabitar en las cavidades nasales de ratas inoculando ambas bacterias a la misma densidad celular (Park *et al.*, 2008, Margolis, 2009). La colonización de neumococo en estos modelos no afectó a la colonización de *S. aureus* (Park *et al.*, 2008, Margolis, 2009). Otros autores, en un modelo de biofilm mixto sobre células epiteliales, no observaron esta asociación negativa pero se discute que la cocolonización con *S. pneumoniae* puede producir que *S. aureus* no realice correctamente la transición de colonización a enfermedad que se da tras una infección vírica (Reddinger *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en esta Tesis, en los que se produce una interacción entre ambas especies, también contradicen la existencia de la relación antagónica.

En el sistema desarrollado de biofilm mixto *in vitro*, se observa que *S. aureus* tiene ventaja en el crecimiento, con respecto a *S. pneumoniae*, ya que neumococo requiere una mayor proporción en el inóculo inicial para conseguir una proporción final en el biofilm mixto similar a la de *S. aureus*. Esto puede deberse a diferentes motivos, entre ellos la naturaleza innata del estafilococo para formar fácilmente biofilms tanto en superficies bióticas como abióticas (Figueiredo *et al.*, 2017). En esta Memoria, se utilizó una superficie abiótica para realizar el ensayo de formación de biofilm (placas multipocillo de poliestireno para los ensayos de recuento de viables y tinción con CV, y placas con fondo de vidrio para el análisis mediante microscopía confocal); en este tipo de superficies tanto las interacciones electroestáticas como hidrofóbicas juegan un papel importante. Es importante destacar que *S. aureus* tiene una ventaja en este tipo de superficies, ya que también usa los ácidos teicoicos cargados negativamente de su pared y su principal autolisina AltA para unirse a superficies de poliestireno y

de vidrio (Moormeier y Bayles, 2017, Gross *et al.*, 2001, Biswas *et al.*, 2006). En el caso de neumococo, este paso de adhesión inicial a superficies abióticas sólo se ha visto mediado por interacciones electroestáticas e hidrofóbicas débiles (Domenech *et al.*, 2012, Chao *et al.*, 2014). Además, como ya se explicó previamente, el CPS de neumococo es un impedimento a la hora de formar biofilm (Domenech *et al.*, 2014). Aunque los neumococos que expresan el serotipo 19A sean considerados buenos formadores de biofilm, este CPS puede interferir con la adhesión inicial de neumococo a la superficie y *S. aureus* puede aprovechar y tomar ventaja dominando la adhesión inicial y formación del biofilm mixto. Aun así, se observa que, cuando la proporción de neumococo es mayor en el inóculo y, por lo tanto, su proporción dentro del biofilm mixto a tiempo final se asemeja a la de *S. aureus*, la biomasa del biofilm es mayor, pudiendo deberse a que la interacción de ambas especies en proporciones iguales sea más estable y formen un mayor biofilm en placas de poliestireno.

En este estudio se han utilizado dos aislados clínicos de *S. aureus*, un aislado SARM y otro SARM y se ha analizado si la resistencia a meticilina pudiera ser un factor que influyera en la interacción con *S. pneumoniae*. Como se comentó anteriormente en el apartado de Introducción, diferentes trabajos han relacionado el nivel de resistencia a antibióticos en aislados SARM con el fenotipo de biofilm (Còrtes *et al.*, 2015, Figueiredo *et al.*, 2017). Las cepas que sobreexpresan *mecA* y presentan mayores niveles de resistencia a meticilina forman más biofilm. En esta Memoria, ambos aislados clínicos de *S. aureus* presentaban un patrón de biofilm similar tanto individualmente como en el biofilm mixto con *S. pneumoniae*.

Uno de los principales retos a abordar respecto a las infecciones causadas por biofilms de *S. aureus* es la inutilidad del tratamiento antibiótico a la hora de tratarlos, especialmente si están causados por cepas SARM (Hogan *et al.*, 2017, Schilcher y Horswill, 2020). Además de no funcionar la terapia antibiótica, esta tiene el potencial de agravar la situación imponiendo una presión selectiva e inducir que proliferen más cepas resistentes a los antibióticos (Ma *et al.*, 2012, Domenech *et al.*, 2018). Una de las alternativas terapéuticas a las enfermedades tanto víricas como bacterianas que ha surgido a lo largo de los últimos años es el uso de agentes mucolíticos, como la NAC y la Cys, caracterizados por presentar grupos tioles (Cazzola *et al.*, 2021). Además de las propiedades antimicrobianas que se aprovecharon posteriormente, estos compuestos pueden tratar un rango amplio de enfermedades respiratorias entre las

que se encuentra la EPOC y el asma (Cazzola *et al.*, 2019). Estas potentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias también han servido para tratar la tormenta de citoquinas y el estrés respiratorio en pacientes con neumonía por SARS-CoV-2 (COVID-19) (Cazzola *et al.*, 2021).

NAC, uno de los fármacos mencionados previamente que sirve de precursor de la síntesis de glutatión, se ha probado previamente para prevenir y tratar biofilms de *S. aureus*, como tratamiento único o en combinación con antibióticos y enzimas (Manoharan *et al.*, 2020). Se ha sugerido que esta actividad antibacteriana de NAC se debe a la competición por la utilización de cisteína con la bacteria, la reducción de los puentes disulfuro de diversas proteínas impidiendo la adhesión bacteriana y la formación de biofilm, o la perturbación del equilibrio redox intracelular de la bacteria (Dinicola *et al.*, 2014, Blasi *et al.*, 2016). También se ha sugerido que NAC podría actuar como un ácido débil en el biofilm, penetrando en la matriz de este y la pared celular de las bacterias que lo componen y, una vez llega al citoplasma bacteriano, se disociaría y acidificaría el biofilm (Kundukad *et al.*, 2017). Cys es otro agente mucolítico que ha sido usado como agente preventivo y terapéutico de biofilms de diversos patógenos incluyendo *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* (Charrier *et al.*, 2014, Guo *et al.*, 2016, Domenech y García, 2017). Una de las principales limitaciones de este compuesto es que se oxida rápidamente en solución, generando un disulfuro inactivo, la cistina (Rushworth y Megson, 2014). Por ello, NAC tiene dos principales ventajas frente a Cys: el grupo -SH de NAC se mantiene reducido más tiempo que el grupo -SH de Cys y el transporte de NAC a través de las membranas celulares se da más fácilmente (Rushworth y Megson, 2014).

En esta Memoria, se ha demostrado el efecto antibacteriano de diferentes concentraciones de Cys en los biofilms de *S. aureus*, confirmando que este compuesto es un buen agente preventivo de la formación de biofilm de SASM y SARM. Cys parece un mejor tratamiento preventivo de biofilms mono-específicos de *S. aureus* que NAC (Manoharan *et al.*, 2020), aunque las condiciones probadas en este estudio no son las mismas que las utilizadas en nuestro trabajo. Además, el tratamiento de biofilms mono-específicos de esta bacteria disminuyó en un 50–60% su viabilidad en el biofilm, mostrando, en este caso, un efecto menor que NAC (Manoharan *et al.*, 2020). Una de las ventajas de nuestro estudio es el uso de aislados clínicos de *S. aureus* y con

diferente susceptibilidad a meticilina (un aislado SASM y un aislado SARM). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral revelan que la resistencia a meticilina no cambia el efecto del agente mucolítico Cys, como ya observaron previamente con NAC (Manoharan *et al.*, 2020). Actualmente, no se han identificado cepas de *S. aureus* tolerantes o resistentes a NAC o Cys.

La prevención de la formación de biofilms mixtos por estos patógenos y el tratamiento de biofilms polimicrobianos asociados a ciertas enfermedades, como otitis media aguda y sinusitis, son estrategias que se deben priorizar. NAC y Cys se han confirmado previamente como buenos candidatos al tratamiento de biofilms polimicrobianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* no tipificable (Domenech y García, 2017). En esta Memoria se describe el efecto antimicrobiano de ambos antioxidantes en los biofilms mixtos de *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Como terapia preventiva, se puede observar que el agente mucolítico Cys fue más efectivo que NAC. Con este último antioxidante se usaron concentraciones por encima de la CMI para conseguir la inhibición del crecimiento y formación del biofilm. Esto también se correlaciona con el bajo valor de CMI de Cys para los tres aislados utilizados, comparado con el de la NAC. Esta diferencia de actividad se puede deber a la oxidación rápida de la Cys comparada con la de la NAC (Rushworth y Megson, 2014) lo que supondría una ventaja a la hora de realizar un ensayo de inhibición del biofilm con el compuesto desde tiempo 0, logrando así que actúe más rápido frente a la población bacteriana inicial del inóculo y evitar la adhesión inicial. Sin embargo, como terapia terapéutica la NAC mostró una actividad antimicrobiana mayor que la de Cys, ya que sólo con 0.5 mg/ml prácticamente se erradicó a la población de *S. pneumoniae*, y con 5 mg/ml de NAC ambas poblaciones de *S. aureus* disminuyeron en un 94–99%, independientemente del fondo de resistencia a meticilina. Cys sólo logró una reducción de, aproximadamente, el 50%. Este menor efecto de Cys ya se había observado previamente en el tratamiento de biofilms mixtos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* no tipificable (Domenech y García, 2017). Este efecto predominante de NAC seguramente se deba a la ventaja que tiene para mantener el puente disulfuro reducido y penetrar tanto la matriz del biofilm como la membrana bacteriana para, posteriormente, ejercer su actividad antibacteriana (Kundukad *et al.*, 2017, Cazzola *et al.*, 2021). Otra ventaja observada en el tratamiento del biofilm con NAC ha sido que este compuesto no dispersa las células bacterianas del biofilm pero sí las mata, lo que supone una ventaja en la práctica clínica ya que al evitar que se dispersen estas células se impide que

remanentes de células bacterianas vivas puedan colonizar otros hábitats en el hospedador produciendo infecciones secundarias.

Como se ha comentado a lo largo de la Memoria, la búsqueda de terapias alternativas a los antibióticos ha sido una de las prioridades de los últimos años debido al incremento de resistencia a los antimicrobianos. Una de las terapias propuestas para sustituir a los antibióticos convencionales consistió en la terapia con fagos y, a principios del presente siglo, las enzimas líticas de fagos han sido ampliamente estudiadas como antibacterianos (Vázquez *et al.*, 2018). Las endolisinas, o simplemente lisinas, son enzimas codificadas por fagos que se sintetizan al final del ciclo de replicación fágico y son capaces de hidrolizar la pared celular bacteriana. Esta actividad enzimática se empezó a explorar como agente antibacteriano y se les empezó a denominar enzibióticos (Nelson *et al.*, 2001), los cuales incluyen también a las enzimas líticas bacterianas, que tendrán varias ventajas sobre los antibióticos convencionales como: matar rápidamente a la bacteria nada más producirse el contacto; pueden ser patógeno-específicas, sobre todo contra bacterias Gram-positivas (Loessner *et al.*, 2002, Fenton *et al.*, 2011) y que es poco probable que se desarrollen resistencias (Briers *et al.*, 2014). Otra de las ventajas de estas lisinas es su arquitectura modular, compuestas normalmente de un dominio con actividad enzimática (romperá el peptidoglicano de la pared) y un dominio de unión a la pared (Pastagia *et al.*, 2013). Esto ha permitido que la actividad antibacteriana de las lisinas se haya ido mejorado mediante biología sintética, en la que se han fabricado lisinas con sus propiedades bioquímicas mejoradas (actividad bactericida, estabilidad, etc.) mediante construcción de proteínas quiméricas y otras estrategias. A estas lisinas sintéticas se les ha denominado lisinas de segunda generación (De Maesschalck *et al.*, 2020) y, en esta Memoria, se han utilizados dos de ellas (Cpl-711 y CHAP<sub>k</sub>). Por último, las de tercera generación, son aquellas lisinas o productos basados en lisinas o formulaciones que sirven para aumentar su actividad antimicrobiana *in vivo* (De Maesschalck *et al.*, 2020). Entre sus principales desventajas, las lisinas tienen problemas de biodisponibilidad en el sitio de infección, la vida media *in vivo* es corta (de 20 a 60 min) y pueden producir una respuesta inmune indeseada cuando se administran sistémicamente (Loeffler *et al.*, 2003, Jado *et al.*, 2003, Doehn *et al.*, 2013, Jun *et al.*, 2017). La formación de nanopartículas de quitosano con residuos de DEAE (ChiDENPs) unidas no covalentemente al enzibiótico Cpl-711 (ChiDENPs-711) constituyen una lisina de tercera generación (Vázquez *et al.*, 2021) con la que se ha trabajado en esta Tesis Doctoral.

Cpl-711, una de las lisinas frente a *S. pneumoniae* con mayor capacidad bactericida hasta la fecha, ya había sido previamente utilizada frente a biofilms *in vitro* de neumococo y frente a neumococos de distintos serotipos adheridos a células epiteliales humanas (Diez-Martínez *et al.*, 2015, Corsini *et al.*, 2018). Este efecto bactericida se mantuvo para *S. pneumoniae* en el sistema del biofilm mixto y mantuvo su gran eficacia ya que, a concentraciones muy pequeñas, ya presentaba actividad bactericida. Los enzibióticos individuales de esta quimera, Cpl-1 y Cpl-7, no presentaban actividad frente a *S. aureus* (Díez Martínez, 2014). Como era esperable, la quimera de ambas lisinas, Cpl-711, no presentó actividad frente a *S. aureus* en el biofilm mixto, independientemente de la resistencia a meticilina. Una de las principales ventajas de las lisinas es su especificidad que, entre otras cosas, permitirá preservar la microbiota normal, pero esta especificidad también hará que su espectro de acción sea reducido (Vázquez *et al.*, 2018).

Por otro lado, se estudió el efecto de CHAP<sub>k</sub>, que es un enzibiótico procedente de una delección artificial de la enzima LysK, conteniendo los primeros 162 aminoácidos de la misma (Fenton *et al.*, 2010, Fenton *et al.*, 2011). Este dominio truncado presentaba mayor actividad que la proteína LysK en sí (Fenton *et al.*, 2011). Esta lisina ha sido efectiva a la hora de disminuir la viabilidad de *S. aureus* en cultivo planctónico (Fenton *et al.*, 2011), de eliminar eficazmente a *S. aureus* de las fosas nasales de ratones (Fenton *et al.*, 2010) y de disminuir la viabilidad de biofilms de *S. aureus* tras un tiempo de exposición de 3–4 h (Fenton *et al.*, 2013). Una de las principales limitaciones de esta endolisina es su alto valor de CMI para las cepas de *S. aureus* probadas en trabajos anteriores (Fenton *et al.*, 2011) y en los aislados clínicos utilizados en esta Memoria. Además, para ver los efectos de disgregación de un biofilm, las condiciones utilizadas en trabajos previos fueron tratamientos muy largos y con altas concentraciones del enzibiótico (Fenton *et al.*, 2013), cuando se compara con las concentraciones de este tipo de lisinas que se suelen utilizar (Domenech *et al.*, 2011, Diez-Martínez *et al.*, 2015). Los resultados experimentales en esta Tesis Doctoral, mostraron que CHAP<sub>k</sub> redujo la viabilidad de los biofilms mono-específicos de *S. aureus* a una concentración subinhibitoria de 25 µg/ml, pero no mostró un mayor efecto usando la CMI (50 µg/ml). En cambio, este efecto se incrementó de forma moderada en la viabilidad de la población de *S. aureus* que formaba parte del biofilm mixto con

*S. pneumoniae*. Respecto a neumococo, Fenton y colaboradores mostraron una reducción en la turbidez acompañada de una reducción en la viabilidad de  $3 \times 10^7$  a  $1.6 \times 10^7$  UFC/ml después de 15 min de tratamiento con 10  $\mu\text{g/ml}$  de CHAP<sub>k</sub> usando la cepa *S. pneumoniae* DSM 11865 (Fenton *et al.*, 2011), una cepa del serotipo 9V aislada en España. Este efecto en la viabilidad de *S. pneumoniae* no se observó en el biofilm mixto con la cepa de serotipo 19A usada (YNM4) realizando el tratamiento con 25 o 50  $\mu\text{g/ml}$  de CHAP<sub>k</sub> durante 1 h.

La importancia de la biodisponibilidad de un tratamiento a la hora de la práctica clínica ha hecho que se desarrollen nuevas técnicas de administración de este tipo de lisinas, que tienen alta actividad bactericida pero un tiempo de vida media *in vivo* bastante reducido (De Maesschalck *et al.*, 2020). El uso de nanopartículas poliméricas para incrementar la biodisponibilidad de estas lisinas y así suplir una de sus principales desventajas es una de las opciones más interesantes. Varios materiales, entre ellos el quitosano, se han utilizado para la construcción de nanopartículas que hagan de vehículos y puedan acceder a localizaciones concretas del organismo, como el pulmón (de Maesschalck *et al.*, 2020). Previamente a este Memoria, se habían utilizado vendas que contenían estas nanopartículas de quitosano cargadas con lisostafina —una hidrolasa del peptidoglicano de estafilococos— mostrando actividad antibacteriana y obteniendo buenos resultados *in vitro* e *in vivo* (Szweda *et al.*, 2014, Nithya *et al.*, 2018). En este sentido, Vázquez y colaboradores estudiaron la actividad antimicrobiana de nanopartículas de quitosano que incorporaban grupos DEAE, que actúan como análogos estructurales de la colina y por lo tanto, unen CBPs (Vázquez *et al.*, 2021). Esta unión de CBPs tiene dos funciones: secuestro de las CBPs de neumococo impidiendo procesos fisiológicos normales de la bacteria y unir enzibióticos como Cpl-711, pudiendo liberarla posteriormente de manera controlada (Vázquez *et al.*, 2021). Estas nanopartículas cargadas ChiDENPs-711 a 37°C y pH 7.4 liberaron más de la mitad de la Cpl-711 que contenían durante las 2–3 primeras horas (hasta el 55% de la carga de lisina) y liberaban el 82% del producto hasta 12 h después (Vázquez *et al.*, 2021). Como ya se ha comentado, una de las limitaciones de nuestro sistema de biofilm mixto es el tiempo de incubación de los tratamientos ya que, a partir de 5 h, había una disminución de viabilidad y de biomasa en el biofilm mixto. Con todo ello, se observa un efecto claro de las ChiDENPs, las ChiDENPs + 5  $\mu\text{g/ml}$  de Cpl-711 y las ChiDENPs-711 a 1 h a 37°C en el biofilm mixto.

El resultado de las ChiDENPs en la viabilidad de *S. aureus* era esperable, ya que previamente se había probado el quitosano como antimicrobiano y, específicamente, frente a esta bacteria (Asli *et al.*, 2017). Normalmente, el efecto del quitosano en la viabilidad depende de la masa molecular, grado de polimerización y grado de desacetilación, pero se vio que un rango amplio de moléculas de quitosano afectaban a *S. aureus* (Asli *et al.*, 2017). En el caso de la viabilidad de *S. pneumoniae*, no se observó efecto de las ChiDENPs, al igual que un trabajo previo (Vázquez *et al.*, 2021). Esto parece deberse a que las ChiDENPs, al tener incorporados grupos DEAE, interfieren con la fisiología normal de las CBPs, por lo que protegen a neumococo de la autólisis y no se aprecia una disminución de la viabilidad (Vázquez *et al.*, 2021). En ese mismo artículo, observaron que al interferir con las CBPs se produce formación de cadenas, fenómeno que no se demuestra en el biofilm mixto maduro al tratarlo durante 1 h con estas nanopartículas, pero sí se observa una acumulación de biomasa que podría deberse a esta interferencia con el funcionamiento normal de las CBPs de neumococo. Por otro lado, al añadir Cpl-711 exógena, se ve que las ChiDENPs no interfieren con la acción de la endolisina ya que erradican casi toda la población de *S. pneumoniae*, atribuyendo la disminución en la viabilidad de *S. aureus* a las nanopartículas “blancas”. Finalmente, el tratamiento con ChiDENPs-711 resultó en una disminución en la viabilidad de ambas especies según los recuentos de viables, aunque la acción sobre la población de *S. pneumoniae* fue menor que usando la Cpl-711 individualmente. Esto era esperable ya que el rango de liberación de estas nanopartículas es de hasta 3 h para liberar el 55% y hasta 12 h para casi la totalidad de su contenido, por lo que 1 h de tratamiento es un tiempo breve. Además, ya se observó que la encapsulación producía cierta pérdida de actividad (Vázquez *et al.*, 2021), que era compensada por otras ventajas (De Maesschalck *et al.*, 2020). El efecto de las ChiDENPs-711 en los biofilms mixtos observados por CLSM fue menor del esperado, obteniéndose un resultado diferente al obtenido en el recuento de viables, pudiéndose deber a una interferencia del material con fondo de vidrio (CLSM) respecto al material con fondo de poliestireno (recuento de viables), este fenómeno ha sido observado previamente con otros biofilm mixtos (Roig-Molina *et al.*, 2019).

La búsqueda de nuevos tratamientos frente a bacterias integrantes de un biofilm es necesaria y está siendo un campo muy activo para apoyar a la práctica clínica. El desarrollo de nuevos fármacos es caro y lento por lo que el reposicionamiento de fármacos suponen una alternativa de gran interés y, de hecho, ha sido promovida por

prestigiosos organismos institucionales como los *National Institutes of Health* (Cragg *et al.*, 2014). Los resultados de esta Tesis Doctoral confirman que el uso de NAC y Cys como candidatos para la prevención y tratamiento de biofilms de *S. aureus* monoespecíficos y biofilms mixtos de *S. aureus*–*S. pneumoniae*, resultan efectivos independientemente de la resistencia a metilina. Ofrecer nuevos usos a fármacos ya aprobados en clínica por las diferentes agencias reguladoras del medicamento es un proceso mucho más rápido y eficiente que el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos. Respecto al desarrollo de terapias innovadoras, el uso de enzibióticos suponen una gran ventaja, ya que el desarrollo de resistencias parece bastante improbable, debido a que se dirigen a un componente estructural y esencial de las bacterias como el peptidoglicano, que no se puede modificar fácilmente sin comprometer la viabilidad bacteriana (Kusuma *et al.*, 2007, Vázquez *et al.*, 2018). Además, la relativa facilidad para aplicar la ingeniería genética en estos compuestos y trabajar con sus diferentes módulos los hace un recurso a tener en cuenta y el más prometedor para desarrollar futuros agentes antimicrobianos (Vázquez *et al.*, 2021).

## 5. EFECTO DEL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO EN BIOFILMS DE *S. AU-REUS* Y BIOFILMS MIXTOS DE *S. AUREUS*-*S. PNEUMONIAE*

Como se ha mencionado previamente, el tabaquismo es uno de los mayores problemas de salud global. Además de las consecuencias más reconocidas como favorecer el desarrollo de cáncer, enfermedades crónicas como la EPOC y enfermedades cardiovasculares, el consumo de tabaco es uno de los mayores factores de riesgo para sufrir infecciones bacterianas (Hutcherson *et al.*, 2015). Este aumento de riesgo no sólo se produce a nivel de enfermedades invasivas como la ENI (Nuorti *et al.*, 2000), sino que también aumenta el riesgo de sufrir enfermedades asociadas a biofilms como otitis media, vaginosis y periodontitis crónica (Bagaitkar *et al.*, 2008). Los mecanismos de la mayor susceptibilidad a infecciones en fumadores no están del todo claros, pero varios estudios los han asociado a una alteración en la regulación del sistema inmune (Arcavi y Benowitz, 2004, Domagala-Kulawik, 2008, Stämpfli y Anderson, 2009). El humo de tabaco puede afectar a la función normal de los neutrófilos, disminuyendo la fagocitosis (Stringer *et al.*, 2007) y la quimiotaxis (Corberand *et al.*, 1979). Además, el HT puede inducir la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios, especies reactivas de oxígeno y enzimas, produciendo daño celular y una función inmune incorrecta (Russell *et al.*, 2002). También se ha visto que el HT disminuye el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), generando un estado de inmunosupresión y colonización microbiana crónica (Laan *et al.*, 2004). Además, se ha observado que produce daño en el parénquima pulmonar, reduciendo el movimiento mucociliar, provocando así una incorrecta eliminación de los microorganismos patógenos (Dye y Adler, 1994). El HT no sólo tiene efecto en el propio ser humano, sino que sus compuestos incluyendo, compuestos químicos bioactivos, pueden afectar también a los microorganismos patógenos que están colonizando la microbiota humana (Kulkarni *et al.*, 2016). En este sentido, hay diversos estudios que han demostrado cómo el EHT aumenta la virulencia de diversos patógenos o microorganismos comensales (Mutepe *et al.*, 2013, Kulkarni *et al.*, 2016, Lacoma *et al.*, 2019, Chien *et al.*, 2020).

El biofilm en la mayoría de los microorganismos se ve influenciado por estímulos ambientales simples como la temperatura, pH, disponibilidad de hierro, etc. Por ello, no resulta sorprendente que el HT, que contiene cientos de sustancias bioactivas y componentes químicos, contribuya afectando de forma significativa en la fisiología

bacteriana y la formación de biofilm (Hutcherson *et al.*, 2015). Cada vez hay más evidencias de que los biofilms de diversos patógenos y comensales se ven afectados por el HT. Esto se ha documentado en *Klebsiella pneumoniae* (Goldstein-Daruech *et al.*, 2011), *P. aeruginosa* (Goldstein-Daruech *et al.*, 2011, Antunes *et al.*, 2012), *Porphyromonas gingivalis* (Bagaitkar *et al.*, 2011, Bagaitkar *et al.*, 2008), *Proteus vulgaris* (Goldstein-Daruech *et al.*, 2011), *S. aureus* (Kulkarni *et al.*, 2012), *S. pneumoniae* (Mutepe *et al.*, 2013, Cockeran *et al.*, 2014), *Streptococcus mutans* (Baboni *et al.*, 2010), *Streptococcus gordonii* (Bagaitkar *et al.*, 2011) y *Streptococcus sanguinis* (Li *et al.*, 2014).

Respecto al efecto que tiene el HT sobre la colonización de *S. aureus*, hay resultados contradictorios y poco concluyentes. Algunos asociaron un efecto protector del HT a la colonización de *S. aureus* (Olsen *et al.*, 2012), mientras que otros no encontraron ninguna asociación significativa (Wang *et al.*, 2010). Diferentes grupos observaron que el HT aumentaba la colonización (Bogaert *et al.*, 2004, Melles *et al.*, 2007, Ramakrishnan y Frank, 2015). En estudios *in vitro* sí que se ha observado cómo el EHT aumenta la formación de biofilm de cepas tipo y aislados clínicos de *S. aureus* (Kulkarni *et al.*, 2012, Lacoma *et al.*, 2019). Kulkarni y colaboradores observaron que la exposición a EHT aumentaba la formación de biofilm de diferentes aislados de *S. aureus*, incluso si esta exposición era breve (Kulkarni *et al.*, 2012). Además, se ha visto un aumento de la regulación transcripcional de *sarA* y *rbf*, que son reguladores positivos del operón *ica* (Beenken *et al.*, 2003, Luong *et al.*, 2009). También se ha demostrado que había una disminución de la expresión de *agrC* en las células tratadas con EHT, siendo el sistema de QS Agr uno de los reguladores de factores de virulencia más importantes y que actúa como regulador negativo del biofilm de *S. aureus* (Boles y Horswill, 2008). Esta regulación negativa de *agr* se producía por el estrés oxidativo mediado por el EHT en los aislados estudiados, ya que AgrA se ve afectado por el estrés oxidativo induciendo la formación de un enlace disulfuro en su dominio de unión a ADN (Cys-199) e impidiendo su unión al promotor de *agr* (Sun *et al.*, 2012). Posteriormente Lancoma y colaboradores demostraron que era necesario un sistema Agr funcional para que hubiese esa formación de biofilm incrementada tras la exposición a EHT (Lacoma *et al.*, 2019). Esto autores demostraron que mutantes en *agr* o aislados clínicos con una actividad de *agr* reducida no se veían afectados por el EHT ni en la formación de biofilm ni en invasión (Lacoma *et al.*, 2019). En los aislados que tenían alta actividad de *agr* sí que se veía el biofilm aumentado

y su expresión se encontraba reducida, limitando además, la expresión de otros factores de virulencia como diferentes toxinas (Lacoma *et al.*, 2019). En nuestro caso se observó que, en todos los aislados clínicos estudiados, se veía afectado el biofilm, aumentado la densidad celular y el grosor del mismo, pero este aumento observado tanto en biomasa ( $A_{595}$ ), como recuento de viables y mediante microscopía confocal, fue mayor en los aislados que eran malos formadores de biofilm a las 20 y 24 h (60040/19 y 62822/15). Los aislados considerados como buenos formadores de biofilm (62600/15 y 60335/19) se vieron más afectados en su crecimiento total y la estructura del biofilm, aunque no tanto en el grosor. Anteriormente se discutió el posible papel de Nuc produciendo éxodos (Moormeier *et al.*, 2014), o del sistema *agr* produciendo las ondas características de formación y disgregación en biofilms tardíos (Yarwood *et al.*, 2004). Esto se ha visto en esta Tesis Doctoral en los aislados que eran malos formadores de biofilm a las 24 h, en los que tenían periodos donde formaban buen biofilm (16–19 y 23 h) y periodos donde formaban mal biofilm (20 y 24 h). La explicación de que haya un mayor efecto del EHT en los aislados que formaban mal biofilm a las 20 y 24 h, que es cuando tienen menos biomasa, podría deberse a que, en estos aislados clínicos, el sistema QS Agr está más activo. De hecho, ya se observó que en aislados clínicos con *agr* más activo, el efecto del EHT sobre el biofilm era mayor (Lacoma *et al.*, 2019). Sobre la base de todas estas observaciones, es muy probable que estas disgregaciones que ocurren en los aislados mal formadores de biofilm a las 20 y 24 h sean producidas por este sistema de QS Agr. En esta Tesis también se ha demostrado que el EHT afecta al crecimiento total, produciendo un aumento del mismo que, posteriormente, se corroboró mediante recuento de viables, siendo un hallazgo novedoso que no se había descrito previamente. También hay que destacar que, a diferencia de otros trabajos que sólo estudian los efectos del EHT en el biofilm mediante análisis de la biomasa por tinción con cristal violeta u otros colorantes, en esta Memoria se emplearon varias aproximaciones experimentales para analizar el efecto del HT. Estos resultados aportan información adicional que no se podía apreciar solo con la cuantificación del biofilm por medición de la biomasa por CV.

Los biofilms monoespecie no suelen encontrarse normalmente en condiciones *in vivo* y, como se ha comentado previamente, las bacterias que siguen la estrategia de formar un biofilm tienen mecanismos para incluir diversidad microbiana (Wolcott *et al.*, 2013). Existen diversos estudios que han demostrado la existencia de infecciones

mixtas relacionadas con el estado de biofilm como otitis, rinitis y sinusitis producidas por patógenos como *S. aureus*, *S. pneumoniae* y otros (Brook, 2016, Welp y Bomberger, 2020, Davcheva-Chakar *et al.*, 2015, Hamilos, 2019). En esta Memoria se han desarrollado varios sistemas *in vitro* de biofilm mixto entre *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Capítulo 4 de esta Memoria) por lo que se decidió investigar el efecto del EHT en estos sistemas multiespecie. En *S. pneumoniae* se había observado previamente que el EHT aumentaba su biofilm, aunque no afectaba al crecimiento y al cultivo planctónico y disminuía la expresión de Ply (Mutepe *et al.*, 2013). En *S. aureus* como se comentó al inicio, se produce una regulación hacia perfiles de persistencia y respuesta a estrés oxidativo (Kulkarni *et al.*, 2012, Lacoma *et al.*, 2019). En esta Tesis se observó que el EHT no producía un aumento de la biomasa ( $A_{595}$ ) del biofilm mixto, pero sí que hubo un aumento de bacterias viables en ambas poblaciones integrantes en los diferentes biofilms mixtos y un aumento del biofilm visualizado por CLSM. También es destacable que se observó una disminución del crecimiento total y de la viabilidad de ambas poblaciones en el cultivo planctónico del biofilm. Además, se pudo comprobar que existe una mayor disminución en las células de *S. aureus* que en las de *S. pneumoniae*, disminuyendo la viabilidad hasta más de la mitad de ambas poblaciones cuando se usó EHT al 10%. Estos hallazgos contrastan con lo observado en las poblaciones formando biofilms mixtos, donde la viabilidad de ambas poblaciones aumentaba en todos los casos y, también, en lo observado en los biofilms monoespecies de *S. aureus*, donde aumentaba la viabilidad del cultivo planctónico del biofilm.

El EHT tiene altas concentraciones de radicales libres y especies reactivas de oxígeno como  $\text{NO}^\cdot$ , radicales  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etc. que alteran vías de señalización y producen efectos inmunomoduladores (Vassallo *et al.*, 2008, Birrell *et al.*, 2008, McMaster *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos antagónicos entre *S. aureus* y *S. pneumoniae* era la muerte de *S. aureus* por radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que se formaban en presencia de neumococo a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otras especies (Wu *et al.*, 2019). Estos radicales hidroxilo inducen la degradación del ADN del estafilococo, produciendo su intoxicación y muerte. Puede que este efecto nocivo en la viabilidad en el cultivo planctónico cuando están presentes ambas poblaciones se deba a esta competencia para sobrevivir al estrés oxidativo que va a producir el EHT y que *S. aureus* se vea más afectado al inicio porque *S. pneumoniae* esté contribuyendo a que el estafilococo se muera.

En el biofilm mixto no se observa esta disminución de la viabilidad, sino que se aprecia un aumento de la viabilidad de ambas especies. Este estado ya de por sí es ventajoso para la supervivencia de ambos patógenos pero, además, se ha visto que los biofilms de *S. aureus* en presencia de este estrés oxidativo, aumentan la transcripción de oxidoreductasas como *ahpC* y *sod*, y se produce una disminución del regulador negativo del biofilm *agr* (Kulkarni *et al.*, 2012). Estas evidencias sugieren que la población de *S. aureus* del biofilm no es igual de susceptible al estrés oxidativo como parece ser la del cultivo planctónico y, además, se favorezcan mecanismos encargados de aumentar su viabilidad. Por último, se observó previamente que el EHT tiene un efecto de respuesta al estrés y persistencia en los biofilms de *S. pneumoniae* produciendo un aumento del biofilm (Mutepe *et al.*, 2013, Cockeran *et al.*, 2014, Cockeran *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren que esta población en el biofilm mixto también puede tener mecanismos de persistencia que sean diferentes a los del cultivo planctónico. El hecho de que el EHT aumente la formación y viabilidad de biofilms mixtos es preocupante en la práctica clínica, ya que puede favorecerse la proliferación de otras especies en el biofilm, dificultando su eliminación.

## 6. EL EFECTO DE LA VACUNA CONJUGADA 13-VALENTE EN LA COLONIZACIÓN DE *S. pneumoniae* y *S. aureus*

El estado de colonización es esencial para la patogénesis de *S. pneumoniae*. Esta colonización comienza poco después del nacimiento, donde el 20–40% de los niños sanos se encuentran colonizados por este microorganismo (Loughran *et al.*, 2019) y, posteriormente, estas tasas de colonización se van reduciendo encontrando tan sólo entre el 5–10% de los adultos colonizados. Además, este estado es un prerrequisito para que el patógeno pueda luego invadir nichos estériles y no estériles causando diferentes patologías como la ENI, neumonía no invasiva, otitis y sinusitis (Weiser *et al.*, 2018). En los últimos años se ha observado que la propia colonización por neumococo predispone al hospedador a sufrir una infección vírica de las vías respiratorias inferiores (Madhi *et al.*, 2004, Gessner *et al.*, 2019, Lewnard *et al.*, 2021), debiéndose principalmente a una modificación de nuestra respuesta inmune tanto en mucosas como a nivel pulmonar y sistémico a estos virus respiratorios, como el virus de la gripe o el SARS-CoV-2 (Carniel *et al.*, 2021, Mitsi *et al.*, 2021).

Se ha observado un efecto claro de las vacunas conjugadas en la colonización por *S. pneumoniae* en la población infantil (Cohen *et al.*, 2012, Moore *et al.*, 2015). Pero además, la mayoría de estudios de vigilancia de diferentes países han detectado una reducción de la ENI causada por serotipos vacunales por la VCN13 en adultos, debido a la vacunación de la población pediátrica, por lo que se refuerza la idea de que la VCN13 previene la colonización de la nasofaringe (Moore *et al.*, 2015, Ladhani *et al.*, 2018, de Miguel *et al.*, 2020). Además, esto deja claro el papel de la población pediátrica como reservorio de neumococo, ya que la colonización por este patógeno se concentra en la población infantil y cómo afectan las vacunas a la colonización en esta población será clave. Otro factor a tener en cuenta es que las pautas vacunales difieren en cómo afectan a la colonización, ya que no se ha identificado en ningún momento protección frente a la colonización con sólo una o dos dosis de la VCN13, mientras que las pautas 2+1, 3+0 y 3+1 (dosis primaria + refuerzo) sí que confieren protección frente a esta (O'Brien *et al.*, 2007, Nicholls *et al.*, 2016, Lewnard *et al.*, 2020).

Aun así, la vacunación directa del adulto parece importante a la hora de evitar los casos de ENI por serotipos vacunales, y también ayudará aún más a reducir los valores de colonización por *S. pneumoniae* en esta población (Milucky *et al.*, 2019). Un estudio en EE. UU. que analizó el impacto de la VCN13 en la colonización en el adulto, mostró unos ratios de portación de neumococo muy bajos debido, seguramente, a una acción conjunta de la vacunación directa y el efecto de rebaño indirecto por la vacunación de la población pediátrica (Milucky *et al.*, 2019). De los serotipos vacunales que se encontraron colonizando la nasofaringe en este estudio, los tres más frecuentes fueron el 19F, 19A y el 3, que son los serotipos vacunales que causan más casos de ENI en adultos mayores de 65 años en EE. UU. (Milucky *et al.*, 2019).

En EE. UU. y Reino Unido no encontraron una reducción en los casos de ENI producidos por el serotipo 3 (Moore *et al.*, 2015, Andrews *et al.*, 2014). Esto se correlaciona con datos del estudio de colonización que valoró la eficacia de la VCN7 vs. la VCN13 y encontraron que la VCN13 no afectaba a la colonización nasofaríngea por el serotipo 3 (Dagan *et al.*, 2013), lo que ha sido corroborado por otros trabajos recientes (Lewnard *et al.*, 2020). Por otro lado, hay países que sí han notificado una reducción en la ENI causada por el serotipo 3 tanto en población pediátrica como en población adulta directamente vacunada (Sings *et al.*, 2019, McLaughlin *et al.*, 2019, de Miguel *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se corresponden más con esta última situación, en la que el suero postVCN13 de adultos sanos sí que protege frente al biofilm del serotipo 3, asociado al estado de colonización. Además de demostrar que la vacuna VCN13 produce anticuerpos funcionales en los pacientes vacunados.

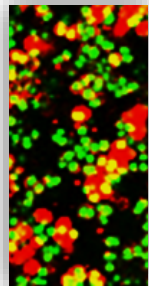
No sólo el serotipo 3 es el único serotipo vacunal que aún sigue causando ENI de manera destacada, los serotipos 14, 19F y 19A tampoco han sido eliminados del todo en los países que usan la VCN13 (Moore *et al.*, 2015, Glikman *et al.*, 2018, Ladhani *et al.*, 2018). Los serotipos 19F y 19A son muy buenos formadores de biofilm con una capacidad remarcable de colonizar la nasofaringe (Domenech *et al.*, 2014), lo que podría explicar por qué siguen teniendo tanta carga en la ENI. El estudio realizado en esta Memoria permite observar que diferentes sueros de sujetos sanos vacunados con la VCN13 son efectivos, al aumentar la opsonofagocitosis de los biofilms de estos dos serotipos, por lo que podríamos sugerir que la vacuna es efectiva frente a la colonización por estos serotipos. La prevalencia de estos serotipos de *S. pneumoniae*

podría deberse a las bajas o insuficientes coberturas vacunales de la población con VCN13 (Milucky *et al.*, 2019, de Miguel *et al.*, 2020). El único serotipo vacunal cuyo biofilm sobrevivió a la OPA a niveles del control fue el del serotipo 14, lo que podría explicar su elevada carga en ENI.

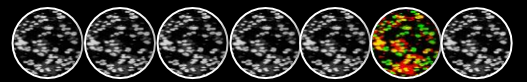
La vacunación ya se ha demostrado como la mejor estrategia para evitar la ENI en pacientes con enfermedades autoinmunes y tratamientos inmunosupresores (Fernandez-Martinez *et al.*, 2016, Richi *et al.*, 2021). Desafortunadamente, se ha descrito que los pacientes con estas enfermedades y con terapia biológica tienen una menor respuesta a las vacunas antineumocócicas y, sobre todo, a las vacunas conjugadas ya que tienen una respuesta celular alterada (van Aalst *et al.*, 2018). El uso de rituximab sólo o en combinación con metotrexato se ha asociado previamente a una respuesta inmune defectuosa a la vacunación en pacientes con artritis reumatoide (Bingham *et al.*, 2010). El metotrexato produce esta respuesta porque este fármaco y sus metabolitos bloquean la síntesis de *de novo* de purinas y afectan a la proliferación de linfocitos B y T (Visser, 2011, Subesinghe *et al.*, 2018). Al contrario, Richi y colaboradores observaron que los pacientes con artritis reumatoide y sometidos a estas terapias biológicas sí que respondían produciendo anticuerpos funcionales que ayudaban a la fagocitosis de seis de los serotipos de *S. pneumoniae* que analizaron (1, 3, 7F, 14, 19A y 19F) (Richi *et al.*, 2021). Posiblemente esto se deba a que los pacientes que estudiaron siguieron la administración recomendada de la vacuna antineumocócica cuatro semanas después de la dosis de la terapia biológica y con una espera de seis meses hasta que se reanude el tratamiento, podría ser la causa que explicara esta diferencia respecto a estudios previos (Pham *et al.*, 2008). En esta Tesis Doctoral, de los tres serotipos vacunales estudiados (3, 19F y 19A), sólo se obtuvo protección frente a los biofilms del serotipo 19F, no habiendo respuesta frente a los biofilms de los serotipos 3 y 19A, a diferencia de lo obtenido por Richi y colaboradores (Richi *et al.*, 2021). Esto no es contradictorio, ya que nosotros evaluamos el efecto de los sueros de pacientes con artritis reumatoides sometidos a terapias biológicas y vacunados con VCN13 o/y VNP23 frente a la colonización por estos serotipos, el estado de biofilm, no frente al estado planctónico que se evaluó en el estudio previo (Richi *et al.*, 2021). Adicionalmente, nuestro estudio tiene la limitación de haber utilizado solo dos sueros y el número de serotipos evaluados, además de que no disponemos de los sueros prevacunales de los pacientes evaluados.

Una de las principales preocupaciones de las vacunas que afectan a la colonización de patógenos que se encuentran en la microbiota es el incremento de la colonización por otros patógenos invasivos. Cuando se elimina una población bacteriana de su nicho puede dejar un hueco que sea ocupado por patógenos que produzcan enfermedades similares o más graves (McDaniel y Swiatlo, 2016, Sempere *et al.*, 2021), lo que justificaría que la inmunización esterilizante no siempre sea un efecto positivo o beneficioso. Una de las principales preocupaciones que surgió desde la introducción de las vacunas conjugadas, que afectaban la colonización de *S. pneumoniae*, es que fuese sustituido por patógenos invasivos respiratorios que colonizan el tracto respiratorio superior como *S. aureus*. Varios estudios indicaban desde principios del actual siglo que la colonización por *S. aureus* y *S. pneumoniae* es antagonista, y que la introducción de las VCN7 podía influir en un aumento de la colonización por el estafilococo (van Gils *et al.*, 2011, Chien *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2013). Un ensayo clínico evaluando el efecto de la VCN7 en la colonización en niños de los Países Bajos, observó que los sujetos vacunados tenían el doble de posibilidades de ser colonizados por *S. aureus* a los 12 meses de edad comparado con el control de no vacunados, pero este efecto podía ser transitorio (van Gils *et al.*, 2011). En estudios epidemiológicos, esta asociación negativa entre *S. aureus* y *S. pneumoniae* se observó con serotipos vacunales de la VCN7 (Regev-Yochay *et al.*, 2004, Spijkerman *et al.*, 2012, Chien *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2013). Por el contrario, numerosos estudios encontraron que no había ninguna asociación negativa entre ambos patógenos y que la vacunación no modificaba la portación en nasofaringe del estafilococo (Cohen *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009, Jacoby *et al.*, 2007, Jourdain *et al.*, 2011). Por último, un estudio de colonización en nasofaringe y oído medio de grupos vacunados con la VCN10 o la VCN13 encontró que, en el grupo de niños vacunados con la VCN13, disminuyó la colonización por *S. aureus*, no sólo de la nasofaringe sino también del oído medio (Leach *et al.*, 2016). En esta Memoria, no se encontró ningún efecto perjudicial con los sueros de sujetos vacunados con la VCN13 en el sentido de afectar a la población de *S. aureus* formando parte de los biofilms tanto mono-específicos como en el biofilm mixto con neumococo. Además, la vacunación con VCN13 reduce el biofilm mono-especie de neumococo, pero también a la población de neumococo cuando forma un biofilm mixto con *S. aureus*. El hecho de que la vacuna disminuya solamente la población de neumococo en el biofilm mixto, podría indicar que, el efecto de la VCN13 reduciendo la colonización de *S. pneumoniae* no afecte al reemplazo de este por otro patógeno respiratorio como *S. aureus*.





## VI. CONCLUSIONES

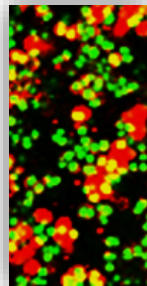




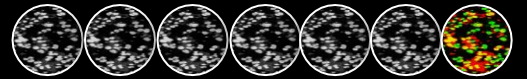
1. Los serotipos 22F y 33F causantes de ENI han aumentado en los últimos años en la población adulta, siendo los clones ST433<sup>22F</sup> y ST717<sup>33F</sup> los predominantes en España.
2. El porcentaje de casos de ENI por los serotipos 22F y 33F se mantiene estable en los últimos años independientemente de que la ENI en España haya disminuido como consecuencia de la pandemia producida por SARS-CoV-2.
3. La mayor formación de biofilm en los aislados clínicos pediátricos de los serotipos 22F y 33F les podría otorgar una ventaja para colonizar la nasofaringe pediátrica favoreciendo de este modo su posible transmisión a la población adulta.
4. Los neumococos de serotipo 22F son más virulentos que los de 33F ya que evaden mejor el sistema inmune, lo que explicaría su mayor prevalencia en España.
5. El cefditoren es una cefalosporina oral que presenta una elevada actividad antimicrobiana con niveles muy bajos de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> sin que apenas existan cepas de neumococo resistentes a este antibiótico.
6. Existe un aumento de casos por serotipos no incluidos en la vacuna VNC13 con sensibilidad disminuida a penicilina y a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
7. El ADNe, las proteínas extracelulares y los exopolisacáridos, parecen ser importantes para el mantenimiento y formación del biofilm de la mayoría de los aislados clínicos de *S. aureus* estudiados.
8. El biofilm *in vitro* de *S. aureus* es un proceso dinámico, mostrando fases de disgregación y de mayor formación que parecen asociarse al ADNe y exopolisacárido.
9. El biofilm de *S. aureus* evade mejor la fagocitosis que el cultivo planctónico, por un mecanismo independiente de la inmunidad mediada por el sistema del complemento.

## CONCLUSIONES

10. La elevada capacidad que tiene *S. aureus* para formar biofilm, hace que sea necesario utilizar una mayor proporción de neumococo para obtener un biofilm mixto homogéneo de ambas bacterias *in vitro*.
11. La cisteamina y la *N*-acetil-L-cisteína son buenos candidatos para el tratamiento de los biofilms mixtos de *S. aureus* y *S. pneumoniae*.
12. El uso de compuestos como la endolisina CHAP<sub>K</sub>, el enzibiótico Cpl-711, o nanopartículas de ChiDENPs, con o sin enzibiótico, pueden ser alternativas terapéuticas frente a biofilms de patógenos respiratorios.
13. El extracto de humo de tabaco favorece la formación de biofilms por *S. aureus* y neumococo lo que podría favorecer fenómenos de persistencia y cronicidad por ambos patógenos.
14. La vacunación con VCN13 estimula la eliminación de los biofilms neumocócicos producidos por serotipos vacunales lo que podría explicar por qué es eficaz generando inmunidad indirecta al prevenir el estado de portador.



## VII. BIBLIOGRAFÍA





- AARESTRUP, F. M., LARSEN, H. D., ERIKSEN, N. H., ELSBERG, C. S. & JENSEN, N. E. 1999. Frequency of  $\alpha$ - and  $\beta$ -haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS*, 107, 425-30.
- ADAMOU, J. E., WIZEMANN, T. M., BARREN, P. & LANGERMANN, S. 1998. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun*, 66, 820-2.
- ADLER, H., NIKOLAOU, E., GOULD, K., HINDS, J., COLLINS, A. M., CONNOR, V., HALES, C., HILL, H., HYDER-WRIGHT, A. D., ZAIDI, S. R., GERMAN, E. L., GRITZFELD, J. F., MITSU, E., POJAR, S., GORDON, S. B., ROBERTS, A. P., RYLANCE, J. & FERREIRA, D. M. 2019. Pneumococcal colonization in healthy adult research participants in the conjugate vaccine era, United Kingdom, 2010–2017. *J Infect Dis*, 219, 1989-93.
- AFSHAR, D., POURMAND, M. R., JEDDI-TEHRANI, M., SABOOR YARAGHI, A. A., AZARSA, M. & SHOKRI, F. 2016. Fibrinogen and fibronectin binding activity and immunogenic nature of choline binding protein M. *Iran J Public Health*, 45, 1610-17.
- AGARWAL, V., SROKA, M., FULDE, M., BERGMANN, S., RIESBECK, K. & BLOM, A. M. 2014. Binding of *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) to complement component C1q modulates the complement attack and promotes host cell adherence. *J Biol Chem*, 289, 15833-44.
- AGUIAR, S. I., SERRANO, I., PINTO, F. R., MELO-CRISTINO, J. & RAMIREZ, M. 2008. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiol*, 8, 41.
- AGUINAGALDE, L., CORSINI, B., DOMENECH, A., DOMENECH, M., CAMARA, J., ARDANUY, C., GARCIA, E., LINARES, J., FENOLL, A. & YUSTE, J. 2015. Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain<sup>9V</sup>-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PLoS One*, 10, e0137565.
- ALDERSON, M. R., TOUGH, T. W., DAVIS-SMITH, T., BRADY, S., FALK, B., SCHOOLEY, K. A., GOODWIN, R. G., SMITH, C. A., RAMSDALL, F. & LYNCH, D. H. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*, 181, 71-7.
- ALLARD, C., CARIGNAN, A., BERGEVIN, M., BOULAIS, I., TREMBLAY, V., ROBICHAUD, P., DUPÉRAL, R. & PEPIN, J. 2008. Secular changes in incidence and mortality associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Quebec, Canada, 1991–2005. *Clin Microbiol Infect*, 14, 421-8.
- ALLEGRUCCI, M., HU, F. Z., SHEN, K., HAYES, J., EHRLICH, G. D., POST, J. C. & SAUER, K. 2006. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J Bacteriol*, 188, 2325-35.
- ALLESEN-HOLM, M., BARKEN, K. B., YANG, L., KLAUSEN, M., WEBB, J. S., KJELLEBERG, S., MOLIN, S., GIVSKOV, M. & TOLKER-NIELSEN, T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*, 59, 1114-28.
- AMAN, M. J., KARAUZUM, H., BOWDEN, M. G. & NGUYEN, T. L. 2010. Structural model of the pre-pore ring-like structure of Pantone-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J Biomol Struct Dyn*, 28, 1-12.
- AMBROSE, J. A. & BARUA, R. S. 2004. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*, 43, 1731-7.
- AMERIGHI, F., VALERI, M., DONNARUMMA, D., MACCARI, S., MOSCHIONI, M., TADDEI, A., LAPAZIO, L., PANSEGRAU, W., BUCCATO, S., DE ANGELIS, G., RUGGIERO, P., MASIGNANI, V., SORIANI, M. & PEZZICOLI, A. 2016. Identification of a monoclonal antibody against pneumococcal pilus 1 ancillary protein impairing bacterial adhesion to human epithelial cells. *J Infect Dis*, 213, 516-22.
- AMIN-CHOWDHURY, Z., GROVES, N., SHEPPARD, C. L., LITT, D., FRY, N. K., ANDREWS, N. & LADHANI, S. N. 2021. Invasive pneumococcal disease due to 22F and 33F in England: a tail of two serotypes. *Vaccine*, 39, 1997-2004.
- ANDREWS, N. J., WAIGHT, P. A., BURBIDGE, P., PEARCE, E., ROALFE, L., ZANCOLLI, M., SLACK, M., LADHANI, S. N., MILLER, E. & GOLDBLATT, D. 2014. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis*, 14, 839-46.
- ANDREWS, N. J., WAIGHT, P. A., GEORGE, R. C., SLACK, M. P. & MILLER, E. 2012. Impact and effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in the elderly in England and Wales. *Vaccine*, 30, 6802-8.

- ANTUNES, M. B., CHI, J. J., LIU, Z., GOLDSTEIN-DARUECH, N., PALMER, J. N., ZHU, J. & COHEN, N. A. 2012. Molecular basis of tobacco-induced bacterial biofilms: an in vitro study. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 147, 876-84.
- ARCAVI, L. & BENOWITZ, N. L. 2004. Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med*, 164, 2206-16.
- ARDANUY, C., DE LA CAMPA, A. G., GARCÍA, E., FENOLL, A., CALATAYUD, L., CERCENADO, E., PÉREZ-TRALLERO, E., BOUZA, E. & LIÑARES, J. 2014. Spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8-ST63 multidrug-resistant recombinant clone, Spain. *Emerg Infect Dis*, 20, 1848-56.
- ARRECUBIETA, C., LÓPEZ, R. & GARCÍA, E. 1996. Type 3-specific synthase of *Streptococcus pneumoniae* (Cap3B) directs type 3 polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* and in pneumococcal strains of different serotypes. *J Exp Med*, 184, 449-55.
- ASLI, A., BROUILLETTE, E., STER, C., GHINET, M. G., BRZEZINSKI, R., LACASSE, P., JACQUES, M. & MALOUIN, F. 2017. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PLoS One*, 12, e0176988.
- ATKINS, K. E., LAFFERTY, E. I., DEENY, S. R., DAVIES, N. G., ROBOTHAM, J. V. & JIT, M. 2018. Use of mathematical modelling to assess the impact of vaccines on antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis*, 18, e204-13.
- ATKINS, K. L., BURMAN, J. D., CHAMBERLAIN, E. S., COOPER, J. E., POUTREL, B., BAGBY, S., JENKINS, A. T., FEIL, E. J. & VAN DEN ELSEN, J. M. 2008. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol*, 45, 1600-11.
- ATTALI, C., DURMORT, C., VERNET, T. & DI GUILMI, A. M. 2008. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun*, 76, 5350-6.
- ATWOOD, D. N., LOUGHRAN, A. J., COURTNEY, A. P., ANTHONY, A. C., MEEKER, D. G., SPENCER, H. J., GUPTA, R. K., LEE, C. Y., BEENKEN, K. E. & SMELTZER, M. S. 2015. Comparative impact of diverse regulatory loci on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Microbiol Open*, 4, 436-51.
- AUSTRIAN, R. 1977. Prevention of pneumococcal infection by immunization with capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: current status of polyvalent vaccines. *J Infect Dis*, 136, S38-S42.
- AUSTRIAN, R. 1981. Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev Infect Dis*, 3, 183-9.
- EVERETT, O. T., MACLEOD, C. M. & MCCARTY, M. J. T. J. O. E. M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. 79, 137-58.
- AZARIAN, T., MITCHELL, P. K., GEORGIEVA, M., THOMPSON, C. M., GHOUILA, A., POLLARD, A. J., VON GOTTFBERG, A., DU PLESSIS, M., ANTONIO, M., KWAMBANA-ADAMS, B. A., CLARKE, S. C., EVERETT, D., CORNICK, J., SADOWY, E., HRYNIEWICZ, W., SKOCZYNSKA, A., MOISI, J. C., MCGEE, L., BEALL, B., METCALF, B. J., BREIMAN, R. F., HO, P. L., REID, R., O'BRIEN, K. L., GLADSTONE, R. A., BENTLEY, S. D. & HANAGE, W. P. 2018. Global emergence and population dynamics of divergent serotype 3 CC180 pneumococci. *PLoS Pathog*, 14, e1007438.
- BABONI, F. B., GUARIZA FILHO, O., MORENO, A. N. & ROSA, E. A. R. 2010. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 138, 427-34.
- BACKHAUS, E., BERG, S., ANDERSSON, R., OCKBORN, G., MALMSTRÖM, P., DAHL, M., NASIC, S. & TROLLFORS, B. 2016. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors. *BMC Infect Dis*, 16, 367.
- BADDOUR, L. M., LOWRANCE, C., ALBUS, A., LOWRANCE, J. H., ANDERSON, S. K. & LEE, J. C. 1992. *Staphylococcus aureus* microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. *J Infect Dis*, 165, 749-53.
- BAGAITKAR, J., DAEP, C. A., PATEL, C. K., RENAUD, D. E., DEMUTH, D. R. & SCOTT, D. A. 2011. Tobacco smoke augments *Porphyromonas gingivalis*-*Streptococcus gordonii* biofilm formation. *PLoS One*, 6, e27386.
- BAGAITKAR, J., DEMUTH, D. R. & SCOTT, D. A. 2008. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. *Tob Induc Dis*, 4, 12.
- BAIR, K. L. & CAMPAGNARI, A. A. 2019. *Moraxella catarrhalis* promotes stable polymicrobial biofilms with the major otopathogens. *Front Microbiol*, 10, 3006.

- BAJIC, G., DEGN, S. E., THIEL, S. & ANDERSEN, G. R. 2015. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J*, 34, 2735-57.
- BALABAN, N. Q., HELAINE, S., LEWIS, K., ACKERMANN, M., ALDRIDGE, B., ANDERSSON, D. I., BRYNILDSEN, M. P., BUMANN, D., CAMILLI, A., COLLINS, J. J., DEHIO, C., FORTUNE, S., GHIGO, J. M., HARDT, W. D., HARMS, A., HEINEMANN, M., HUNG, D. T., JENAL, U., LEVIN, B. R., MICHIELS, J., STORZ, G., TAN, M. W., TENSON, T., VAN MELDEREN, L. & ZINKERNAGEL, A. 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol*, 17, 441-48.
- BALACHANDRAN, P., BROOKS-WALTER, A., VIROLAINEN-JULKUNEN, A., HOLLINGSHEAD, S. K. & BRILES, D. E. 2002. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 70, 2526-34.
- BALLANTI, E., PERRICONE, C., GRECO, E., BALLANTI, M., DI MUZIO, G., CHIMENTI, M. S. & PERRICONE, R. 2013. Complement and autoimmunity. *Immunol Res*, 56, 477-91.
- BALSALOBRE, L., HERNÁNDEZ-MADRID, A., LLULL, D., MARTÍN-GALIANO, A. J., GARCÍA, E., FENOLL, A. & DE LA CAMPA, A. G. 2006. Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol*, 44, 4163-71.
- BALSELLS, E., DAGAN, R., YILDIRIM, I., GOUNDER, P. P., STEENS, A., MUÑOZ-ALMAGRO, C., MAMELI, C., KANDASAMY, R., GIVON LAVI, N., DAPRAI, L., VAN DER ENDE, A., TRZCIŃSKI, K., NZENZE, S. A., MEIRING, S., FOSTER, D., BULKOW, L. R., RUDOLPH, K., VALERO-RELLO, A., DUCKER, S., VESTRHEIM, D. F., VON GOTTBERG, A., PELTON, S. I., ZUCCOTTI, G., POLLARD, A. J., SANDERS, E. A. M., CAMPBELL, H., MADHI, S. A., NAIR, H. & KYAW, M. H. 2018. The relative invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* among children after PCV introduction: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*, 77, 368-78.
- BALSELLS, E., GUILLOT, L., NAIR, H. & KYAW, M. H. 2017. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 12, e0177113.
- BARAFF, L. J., LEE, S. I. & SCHRIGER, D. L. 1993. Outcomes of bacterial meningitis in children: a meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*, 12, 389-94.
- BARDIAU, M., DETILLEUX, J., FARNIR, F., MAINIL, J. G. & OTE, I. 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 169, 74-9.
- BARNARD, J. P. & STINSON, M. W. 1996. The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun*, 64, 3853-7.
- BAROCCHI, M. A., RIES, J., ZOGAJ, X., HEMSLEY, C., ALBIGER, B., KANTH, A., DAHLBERG, S., FERNEBRO, J., MOSCHIONI, M., MASIGNANI, V., HULTENBY, K., TADDEI, A. R., BEITER, K., WARTHA, F., VON EULER, A., COVACCI, A., HOLDEN, D. W., NORMARK, S., RAPPUOLI, R. & HENRIQUES-NORMARK, B. 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2857-62.
- BARTLETT, A. H. & HULTEN, K. G. 2010. *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *Pediatr Infect Dis J*, 29, 860-1.
- BÄTTIG, P., HATHAWAY, L. J., HOFER, S. & MÜHLEMANN, K. 2006. Serotype-specific invasiveness and colonization prevalence in *Streptococcus pneumoniae* correlate with the lag phase during in vitro growth. *Microbes Infect*, 8, 2612-7.
- BECKER, K., SCHAUMBURG, F., FEGELER, C., FRIEDRICH, A. W. & KÖCK, R. 2017. *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *Int J Med Microbiol*, 307, 21-7.
- BECKER, K., VAN ALLEN, S., IDELEVICH, E. A., SCHLEIMMER, N., SEGGEWIR, J., MELLMANN, A., KASPAR, U. & PETERS, G. 2018. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 24, 242-248.
- BECKER, S., FRANKEL, M. B., SCHNEEWIND, O. & MISSIAKAS, D. 2014. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 1574-9.
- BEENKEN, K. E., BLEVINS, J. S. & SMELTZER, M. S. 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun*, 71, 4206-11.
- BELKAID, Y. & HAND, T. W. 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157, 121-41.
- BENTLEY, S. D., AANENSEN, D. M., MAVROIDI, A., SAUNDERS, D., RABBINOWITSCH, E., COLLINS, M., DONOHOE, K., HARRIS, D., MURPHY, L., QUAIL, M. A., SAMUEL, G., SKOVSTED, I. C., KALTOFT, M. S., BARRELL, B., REEVES, P. R., PARKHILL, J. & SPRATT, B. G. 2006. Genetic

- analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*, 2, e31.
- BHATTACHARYA, M., BERENDS, E. T. M., CHAN, R., SCHWAB, E., ROY, S., SEN, C. K., TORRES, V. J. & WOZNIAK, D. J. 2018. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 7416-21.
- BINGHAM, C. O., 3RD, LOONEY, R. J., DEODHAR, A., HALSEY, N., GREENWALD, M., CODDING, C., TRZASKOMA, B., MARTIN, F., AGARWAL, S. & KELMAN, A. 2010. Immunization responses in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab: results from a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum*, 62, 64-74.
- BIRRELL, M. A., WONG, S., CATLEY, M. C. & BELVISI, M. G. 2008. Impact of tobacco-smoke on key signaling pathways in the innate immune response in lung macrophages. *J Cell Physiol*, 214, 27-37.
- BISHOP, C. J., AANENSEN, D. M., JORDAN, G. E., KILIAN, M., HANAGE, W. P. & SPRATT, B. G. 2009. Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol*, 7, 3.
- BISWAS, R., VOGGU, L., SIMON, U. K., HENTSCHEL, P., THUMM, G. & GÖTZ, F. 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett*, 259, 260-8.
- BLASI, F., PAGE, C., ROSSOLINI, G. M., PALLECCHI, L., MATERA, M. G., ROGLIANI, P. & CAZZOLA, M. 2016. The effect of *N*-acetylcysteine on biofilms: implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respir Med*, 117, 190-7.
- BLOM, A. M., VILLOUTREIX, B. O. & DAHLBÄCK, B. 2003. Mutations in  $\alpha$ -chain of C4BP that selectively affect its factor I cofactor function. *J Biol Chem*, 278, 43437-42.
- BOGAERT, D., DE GROOT, R. & HERMANS, P. W. 2004a. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4, 144-54.
- BOGAERT, D., THOMPSON, C. M., TRZCINSKI, K., MALLEY, R. & LIPSITCH, M. 2010. The role of complement in innate and adaptive immunity to pneumococcal colonization and sepsis in a murine model. *Vaccine*, 28, 681-5.
- BOGAERT, D., VAN BELKUM, A., SLUIJTER, M., LUIJENDIJK, A., DE GROOT, R., RÜMKE, H. C., VERBRUGH, H. A. & HERMANS, P. W. 2004b. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet*, 363, 1871-2.
- BOLES, B. R. & HORSWILL, A. R. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 4, e1000052.
- BONTEN, M. J., HUIJTS, S. M., BOLKENBAAS, M., WEBBER, C., PATTERSON, S., GAULT, S., VAN WERKHOVEN, C. H., VAN DEURSEN, A. M., SANDERS, E. A., VERHEIJ, T. J., PATTON, M., MCDONOUGH, A., MORADOGHLI-HAFTVANI, A., SMITH, H., MELLELIEU, T., PRIDE, M. W., CROWTHER, G., SCHMOELE-THOMA, B., SCOTT, D. A., JANSEN, K. U., LOBATTO, R., OOSTERMAN, B., VISSER, N., CASPERS, E., SMORENBURG, A., EMINI, E. A., GRUBER, W. C. & GROBBEE, D. E. 2015. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *N Engl J Med*, 372, 1114-25.
- BOSCH, A. A., BIESBROEK, G., TRZCINSKI, K., SANDERS, E. A. & BOGAERT, D. 2013. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog*, 9, e1003057.
- BOSE, J. L., LEHMAN, M. K., FEY, P. D. & BAYLES, K. W. 2012. Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS One*, 7, e42244.
- BOTELHO, R. J. & GRINSTEIN, S. 2011. Phagocytosis. *Curr Biol*, 21, R533-8.
- BRIDGETT, M. J., DAVIES, M. C. & DENYER, S. P. 1992. Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants. *Biomaterials*, 13, 411-6.
- BRIERS, Y., WALMAGH, M., GRYMOPREZ, B., BIEBL, M., PIRNAY, J. P., DEFRAINE, V., MICHIELS, J., CENENS, W., AERTSEN, A., MILLER, S. & LAVIGNE, R. 2014. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 3774-84.
- BRILES, D. E., ADES, E., PATON, J. C., SAMPSON, J. S., CARLONE, G. M., HUEBNER, R. C., VIROLAINEN, A., SWIATLO, E. & HOLLINGSHEAD, S. K. 2000. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 68, 796-800.
- BROOK, I. 2016. Microbiology of chronic rhinosinusitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35, 1059-68.

- BROOKS-WALTER, A., BRILES, D. E. & HOLLINGSHEAD, S. K. 1999. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*, 67, 6533-42.
- BROWN, A. O., MANN, B., GAO, G., HANKINS, J. S., HUMANN, J., GIARDINA, J., FAVERIO, P., RESTREPO, M. I., HALADE, G. V., MORTENSEN, E. M., LINDSEY, M. L., HANES, M., HAPPEL, K. I., NELSON, S., BAGBY, G. J., LORENT, J. A., CARDINAL, P., GRANADOS, R., ESTEBAN, A., LESAUX, C. J., TUOMANEN, E. I. & ORIHUELA, C. J. 2014. *Streptococcus pneumoniae* translocates into the myocardium and forms unique microlesions that disrupt cardiac function. *PLoS Pathog*, 10, e1004383.
- BROWN, J. S., HUSSELL, T., GILLILAND, S. M., HOLDEN, D. W., PATON, J. C., EHRENSTEIN, M. R., WALPURT, M. J. & BOTTO, M. 2002. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16969-74.
- BRUEGGEMANN, A. B., JANSEN VAN RENSBURG, M. J., SHAW, D., MCCARTHY, N. D., JOLLEY, K. A., MAIDEN, M. C. J., VAN DER LINDEN, M. P. G., AMIN-CHOWDHURY, Z., BENNETT, D. E., BORROW, R., BRANDILEONE, M. C., BROUGHTON, K., CAMPBELL, R., CAO, B., CASANOVA, C., CHOI, E. H., CHU, Y. W., CLARK, S. A., CLAUS, H., COELHO, J., CORCORAN, M., COTTRELL, S., CUNNEY, R. J., DALBY, T., DAVIES, H., DE GOUVEIA, L., DEGHMANE, A. E., DEMCZUK, W., DESMET, S., DREW, R. J., DU PLESSIS, M., ERLENDSDOTTIR, H., FRY, N. K., FUURSTED, K., GRAY, S. J., HENRIQUES-NORMARK, B., HALE, T., HILTY, M., HOFFMANN, S., HUMPHREYS, H., IP, M., JACOBSSON, S., JOHNSTON, J., KOZAKOVA, J., KRISTINSSON, K. G., KRIZOVA, P., KUCH, A., LADHANI, S. N., LÂM, T. T., LEBEDOVA, V., LINDHOLM, L., LITT, D. J., MARTIN, I., MARTINY, D., MATTHEUS, W., MCELLIGOTT, M., MEEHAN, M., MEIRING, S., MÖLLING, P., MORFELDT, E., MORGAN, J., MULHALL, R. M., MUÑOZ-ALMAGRO, C., MURDOCH, D. R., MURPHY, J., MUSILEK, M., MZABI, A., PEREZ-ARGÜELLO, A., PERRIN, M., PERRY, M., REDIN, A., ROBERTS, R., ROBERTS, M., ROKNEY, A., RON, M., SCOTT, K. J., SHEPPARD, C. L., SIIRA, L., SKOCZYŃSKA, A., SLOAN, M., SLOTVED, H. C., SMITH, A. J., SONG, J. Y., TAHA, M. K., TOROPAINEN, M., TSANG, D., VAINIO, A., VAN SORGE, N. M., VARON, E., VLACH, J., VOGEL, U., VOHRNOVA, S., VON GOTTFBERG, A., ZANELLA, R. C. & ZHOU, F. 2021. Changes in the incidence of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* during the COVID-19 pandemic in 26 countries and territories in the Invasive Respiratory Infection Surveillance Initiative: a prospective analysis of surveillance data. *Lancet Digit Health*, 3, e360-70.
- BRUEGGEMANN, A. B., PAI, R., CROOK, D. W. & BEALL, B. 2007. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog*, 3, e168.
- BRUEGGEMANN, A. B. & SPRATT, B. G. 2003. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol*, 41, 4966-70.
- BRUNDISH, D. E. & BADDILEY, J. 1968. Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J*, 110, 573-82.
- BRYERS, J. D. 2008. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 100, 1-18.
- BRZIN, B. 1969. Reversion of  $\alpha$ - into  $\beta$ -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia*, 25, 985-6.
- BUDHANI, R. K. & STRUTHERS, J. K. 1997. The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 40, 601-2.
- BUI, L. M., CONLON, B. P. & KIDD, S. P. 2017. Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus*. *Essays Biochem*, 61, 71-9.
- BUKOWSKI, M., WLADYKA, B. & DUBIN, G. 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 2, 1148-65.
- BULLARD, D. C., KUNKEL, E. J., KUBO, H., HICKS, M. J., LORENZO, I., DOYLE, N. A., DOERSCHUK, C. M., LEY, K. & BEAUDET, A. L. 1996. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med*, 183, 2329-36.
- BURIAN, M., RAUTENBERG, M., KOHLER, T., FRITZ, M., KRISMER, B., UNGER, C., HOFFMANN, W. H., PESCHEL, A., WOLZ, C. & GOERKE, C. 2010. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *J Infect Dis*, 201, 1414-21.

- BURMAN, J. D., LEUNG, E., ATKINS, K. L., O'SEAGHDHA, M. N., LANGO, L., BERNADÓ, P., BAGBY, S., SVERGUN, D. I., FOSTER, T. J., ISENMAN, D. E. & VAN DEN ELSEN, J. M. 2008. Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 283, 17579-93.
- BURNAUGH, A. M., FRANTZ, L. J. & KING, S. J. 2008. Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J Bacteriol*, 190, 221-30.
- CALBO, E. & GARAU, J. 2010. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 107-13.
- CALBO, E. & GARAU, J. 2011. Factors affecting the development of systemic inflammatory response syndrome in pneumococcal infections. *Curr Opin Infect Dis*, 24, 241-7.
- CALIX, J. J., PORAMBO, R. J., BRADY, A. M., LARSON, T. R., YOTHER, J., ABEYGUNWARDANA, C. & NAHM, M. H. 2012. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J Biol Chem*, 287, 27885-94.
- CAMELO-CASTILLO, A., HENARES, D., BROTONS, P., GALIANA, A., RODRÍGUEZ, J. C., MIRA, A. & MUÑOZ-ALMAGRO, C. 2019. Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects. *Front Microbiol*, 10, 11.
- CANVIN, J. R., MARVIN, A. P., SIVAKUMARAN, M., PATON, J. C., BOULNOIS, G. J., ANDREW, P. W. & MITCHELL, T. J. 1995. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis*, 172, 119-23.
- CARNIEL, B. F., MARCON, F., RYLANCE, J., GERMAN, E. L., ZAIDI, S., REINÉ, J., NEGERA, E., NIKOLAOU, E., POJAR, S., SOLÓRZANO, C., COLLINS, A. M., CONNOR, V., BOGAERT, D., GORDON, S. B., NAKAYA, H. I., FERREIRA, D. M., JOCHEMS, S. P. & MITSU, E. 2021. Pneumococcal colonization impairs mucosal immune responses to live attenuated influenza vaccine. *JCI Insight*, 6, e141088.
- CARROLL, M. C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, 16, 545-68.
- CARROLL, M. C. 2000. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol*, 74, 61-88.
- CASADEVALL, A. 1996. Crisis in infectious diseases: time for a new paradigm? *Clin Infect Dis*, 23, 790-4.
- CASADEVALL, A. & SCHARFF, M. D. 1994. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 1695-702.
- CASADEVALL, A. & SCHARFF, M. D. 1995. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 21, 150-61.
- CASANOVA, C., KÜFFER, M., LEIB, S. L. & HILTY, M. 2021. Re-emergence of invasive pneumococcal disease (IPD) and increase of serotype 23B after easing of COVID-19 measures, Switzerland, 2021. *Emerg Microbes Infect*, 1-10.
- CASSINI, A., PLACHOURAS, D., ECKMANNS, T., ABU SIN, M., BLANK, H. P., DUCOMBLE, T., HALLER, S., HARDER, T., KLINGEBERG, A., SIXTENSSON, M., VELASCO, E., WEIß, B., KRAMARZ, P., MONNET, D. L., KRETZSCHMAR, M. E. & SUETENS, C. 2016. Burden of six healthcare-associated infections on european population health: estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study. *PLoS Med*, 13, e1002150.
- CASSIOLATO, A. P., ALMEIDA, S. C. G., ANDRADE, A. L., MINAMISAVA, R. & BRANDILEONE, M. C. C. 2018. Expansion of the multidrug-resistant clonal complex 320 among invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A after the introduction of a ten-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *PLoS One*, 13, e0208211.
- CAZZOLA, M., CALZETTA, L., PAGE, C., ROGLIANI, P. & MATERA, M. G. 2019. Thiol-based drugs in pulmonary medicine: much more than mucolytics. *Trends Pharmacol Sci*, 40, 452-463.
- CAZZOLA, M., ROGLIANI, P., SALVI, S. S., ORA, J. & MATERA, M. G. 2021. Use of thiols in the treatment of COVID-19: Current Evidence. *Lung*, 199, 335-43.
- CHA, Y., CHUN, J., SON, B. & RYU, S. 2019. Characterization and genome analysis of *Staphylococcus aureus* podovirus CSA13 and its anti-biofilm capacity. *Viruses*, 11, 54.

- CHAGUZA, C., HEINSBROEK, E., GLADSTONE, R. A., TAFATATHA, T., ALAERTS, M., PENO, C., CORNICK, J. E., MUSICHA, P., BAR-ZEEV, N., KAMNG'ONA, A., KADIOGLU, A., MCGEE, L., HANAGE, W. P., BREIMAN, R. F., HEYDERMAN, R. S., FRENCH, N., EVERETT, D. B. & BENTLEY, S. D. 2020. Early signals of vaccine-driven perturbation seen in pneumococcal carriage population genomic data. *Clin Infect Dis*, 70, 1294-303.
- CHAIGNON, P., SADOVSKAYA, I., RAGUNAH, C., RAMASUBBU, N., KAPLAN, J. B. & JABBOURI, S. 2007. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 125-32.
- CHAMBERS, H. F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*, 7, 178-82.
- CHAMBERS, H. F. & DELEO, F. R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 7, 629-41.
- CHAN, P. F. & FOSTER, S. J. 1998. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 180, 6232-41.
- CHAN, W. T., DOMENECH, M., MORENO-CORDOBA, I., NAVARRO-MARTINEZ, V., NIETO, C., MOSCOSO, M., GARCÍA, E. & ESPINOSA, M. 2018. The *Streptococcus pneumoniae* *yefM-yoeB* and *relBE* toxin-antitoxin operons participate in oxidative stress and biofilm formation. *Toxins*, 10, 378.
- CHAN, Y. G., KIM, H. K., SCHNEEWIND, O. & MISSIAKAS, D. 2014. The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes. *J Biol Chem*, 289, 15680-90.
- CHAO, Y., MARKS, L. R., PETTIGREW, M. M. & HAKANSSON, A. P. 2014. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 194.
- CHARRIER, C., RODGER, C., ROBERTSON, J., KOWALCZUK, A., SHAND, N., FRASER-PITT, D., MERCER, D. & O'NEIL, D. 2014. Cysteamine (Lynovex®), a novel mucoactive antimicrobial & antibiofilm agent for the treatment of cystic fibrosis. *Orphanet J Rare Dis*, 9, 189.
- CHAVAKIS, T., HUSSAIN, M., KANSE, S. M., PETERS, G., BRETZEL, R. G., FLOCK, J. I., HERRMANN, M. & PREISSNER, K. T. 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med*, 8, 687-93.
- CHÁVEZ, A. F., COMAS, L. G., MORENO, J. C. S., MORENO, R. C., DE PROVENS, O. C. P. & ANDRÉS, J. M. A. 2021. Effect of childhood pneumococcal vaccination and beta-lactam antibiotic use on the incidence of invasive pneumococcal disease in the adult population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 40, 1529-38.
- CHESTER, F. D. 1909. *A manual of determinative bacteriology*, The Macmillan Co., New York.
- CHEUNG, G. Y., WANG, R., KHAN, B. A., STURDEVANT, D. E. & OTTO, M. 2011. Role of the accessory gene regulator *agr* in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun*, 79, 1927-35.
- CHEW, S. C., YAM, J. K. H., MATYSIK, A., SENG, Z. J., KLEBENSBERGER, J., GIVSKOV, M., DOYLE, P., RICE, S. A., YANG, L. & KJELLEBERG, S. 2018. Matrix polysaccharides and SiaD diguanylate cyclase alter community structure and competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* during dual-species biofilm development with *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 9, , e00585-18.
- CHIEN, J., HWANG, J. H., NILAAD, S., MASSO-SILVA, J. A., JEONG AHN, S., MCEACHERN, E. K., MOSHENSKY, A., BYUN, M. K. & CROTTY ALEXANDER, L. E. 2020. Cigarette smoke exposure promotes virulence of *Pseudomonas aeruginosa* and induces resistance to neutrophil killing. *Infect Immun*, 88, , e00585-18.
- CHIEN, Y. W., VIDAL, J. E., GRIJALVA, C. G., BOZIO, C., EDWARDS, K. M., WILLIAMS, J. V., GRIFFIN, M. R., VERASTEGUI, H., HARTINGER, S. M., GIL, A. I., LANATA, C. F. & KLUGMAN, K. P. 2013. Density interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young Peruvian children. *Pediatr Infect Dis J*, 32, 72-7.
- CHOI, E. H., ZHANG, F., LU, Y. J. & MALLEY, R. 2016. Capsular polysaccharide (CPS) release by serotype 3 pneumococcal strains reduces the protective effect of anti-type 3 CPS antibodies. *Clin Vaccine Immunol*, 23, 162-7.
- CHRISTOPHE, B. L., MOTT, M., DA CUNHA, G., CAIERÃO, J., P, D. A. & DIAS, C. 2018. Characterisation of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive disease in adults following the introduction of PCV10 in Brazil. *J Med Microbiol*, 67, 687-94.

- CLAVERYS, J. P. & HÅVARSTEIN, L. S. 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol*, 5, 219-29.
- COATES, H., THORNTON, R., LANGLANDS, J., FILION, P., KEIL, A. D., VIJAYASEKARAN, S. & RICHMOND, P. 2008. The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 138, 778-81.
- COCCHIARO, J. L., GOMEZ, M. I., RISLEY, A., SOLINGA, R., SORDELLI, D. O. & LEE, J. C. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 59, 948-60.
- COCKERAN, R., DIX-PEEK, T., DICKENS, C., STEEL, H. C., ANDERSON, R. & FELDMAN, C. 2020. Biofilm formation and induction of stress response genes is a common response of several serotypes of the pneumococcus to cigarette smoke condensate. *J Infect*, 80, 204-209.
- COCKERAN, R., HERBERT, J. A., MITCHELL, T. J., DIX-PEEK, T., DICKENS, C., ANDERSON, R. & FELDMAN, C. 2014. Exposure of a 23F serotype strain of *Streptococcus pneumoniae* to cigarette smoke condensate is associated with selective upregulation of genes encoding the two-component regulatory system 11 (TCS11). *Biomed Res Int*, 2014, 976347.
- COFFEY, T. J., DANIELS, M., MCDUGAL, L. K., DOWSON, C. G., TENOVER, F. C. & SPRATT, B. G. 1995. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 1306-13.
- COHEN, R., FINN, T., BABUSHKIN, F., GELLER, K., ALEXANDER, H., SHAPIRO, M., UDA, M., MOSTRCHY, A. R., AMASH, R., SHIMONI, Z., PAIKIN, S., ILANI, A. & LELLOUCHE, J. 2021. High rate of bacterial respiratory tract co-infections upon admission amongst moderate to severe COVID-19 patients. *Infect Dis (Lond)*, 2021, 1-11.
- COHEN, R., LEVY, C., BINGEN, E., KOSKAS, M., NAVE, I. & VARON, E. 2012. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*, 31, 297-301.
- COHEN, R., LEVY, C., THOLLOT, F., DE LA ROCQUE, F., KOSKAS, M., BONNET, E., FRITZELL, B. & VARON, E. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine does not influence *Staphylococcus aureus* carriage in young children with acute otitis media. *Clin Infect Dis*, 45, 1583-7.
- CONTOU, D., CLAUDINON, A., PAJOT, O., MICAËLO, M., LONGUET FLANDRE, P., DUBERT, M., CALLY, R., LOGRE, E., FRAISSÉ, M., MENTEC, H. & PLANTEFÈVE, G. 2020. Bacterial and viral co-infections in patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia admitted to a French ICU. *Ann Intensive Care*, 10, 119.
- CORBERAND, J., NGUYEN, F., DO, A. H., DUTAU, G., LAHARRAGUE, P., FONTANILLES, A. M. & GLEIZES, B. 1979. Effect of tobacco smoking on the functions of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 23, 577-81.
- CORSINI, B., DÍEZ-MARTÍNEZ, R., AGUINAGALDE, L., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., GARCÍA-FERNANDEZ, E., LETRADO, P., GARCÍA, P. & YUSTE, J. 2018. Chemotherapy with phage lysins reduces pneumococcal colonization of the respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother*, 62, e02212-17.
- CÔRTEZ, M. F., BELTRAME, C. O., RAMUNDO, M. S., FERREIRA, F. A. & FIGUEIREDO, A. M. 2015. The influence of different factors including *fnbA* and *mecA* expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. *Int J Med Microbiol*, 305, 140-7.
- COSSART, P. & SANSONETTI, P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304, 242-8.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-45.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22.
- CRAGG, G. M., GROTHAUS, P. G. & NEWMAN, D. J. 2014. New horizons for old drugs and drug leads. *J Nat Prod*, 77, 703-23.
- CRAIN, M. J., WALTMAN, W. D., 2ND, TURNER, J. S., YOTHER, J., TALKINGTON, D. F., MCDANIEL, L. S., GRAY, B. M. & BRILES, D. E. 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 58, 3293-9.
- CRAMTON, S. E., GERKE, C., SCHNELL, N. F., NICHOLS, W. W. & GÖTZ, F. 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 67, 5427-33.

- CRISÓSTOMO, M. I., VOLLMER, W., KHARAT, A. S., INHÜLSEN, S., GEHRE, F., BUCKENMAIER, S. & TOMASZ, A. 2006. Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 61, 1497-509.
- CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I. & PENADÉS, J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, 183, 2888-96.
- CUCARELLA, C., TORMO, M. A., UBEDA, C., TROTONDA, M. P., MONZÓN, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. & PENADÉS, J. R. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 72, 2177-85.
- CUCCHIARI, D., PERICÁS, J. M., RIERA, J., GUMUCIO, R., MD, E. C. & NICOLÁS, D. 2020. Pneumococcal superinfection in COVID-19 patients: A series of 5 cases. *Med Clin (Barc)*, 155, 502-5.
- CUI, Y. A., PATEL, H., O'NEIL, W. M., LI, S. & SADDIER, P. 2017. Pneumococcal serotype distribution: a snapshot of recent data in pediatric and adult populations around the world. *Hum Vaccin Immunother*, 13, 1-13.
- CUNDELL, D. R., GERARD, C., IDANPAAN-HEIKKILA, I., TUOMANEN, E. I. & GERARD, N. P. 1996. Paf receptor anchors *Streptococcus pneumoniae* to activated human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol*, 416, 89-94.
- CUNNION, K. M., LEE, J. C. & FRANK, M. M. 2001. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 69, 6796-803.
- CUSUMANO, J. A., DUPPER, A. C., MALIK, Y., GAVIOLI, E. M., BANGA, J., BERBEL CABAN, A., NADKARNI, D., OBLA, A., VASA, C. V., MAZO, D. & ALTMAN, D. R. 2020. *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients infected with COVID-19: a case series. *Open Forum Infect Dis*, 7, ofaa518.
- DA SILVA, A. J., DE BAPTISTA-NETO, A., DO CARMO CILENTO, M., DE CAMPOS GIORDANO, R. & ZANGIROLAMI, T. C. 2008. Bioreactor aeration conditions modulate growth and antigen expression during *Erysipelothrix rhusiopathiae* cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79, 23-31.
- DAGAN, R., PATTERSON, S., JUERGENS, C., GREENBERG, D., GIVON-LAVI, N., PORAT, N., GURTMAN, A., GRUBER, W. C. & SCOTT, D. A. 2013. Comparative immunogenicity and efficacy of 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines in reducing nasopharyngeal colonization: a randomized double-blind trial. *Clin Infect Dis*, 57, 952-62.
- DAHLGREN, C. & KARLSSON, A. 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*, 232, 3-14.
- DASSY, B., STRINGFELLOW, W. T., LIEB, M. & FOURNIER, J. M. 1991. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J Gen Microbiol*, 137, 1155-62.
- DAVCHEVA-CHAKAR, M., KAFTANDZHIEVA, A. & ZAFIROVSKA, B. 2015. Adenoid vegetations — reservoir of bacteria for chronic otitis media with effusion and chronic rhinosinusitis. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*, 36, 71-6.
- DAVE, S., BROOKS-WALTER, A., PANGBURN, M. K. & MCDANIEL, L. S. 2001. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun*, 69, 3435-7.
- DAVIS, K. M., AKINBI, H. T., STANDISH, A. J. & WEISER, J. N. 2008. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*, 4, e1000241.
- DAWOOD, F. S., FIORE, A., KAMIMOTO, L., NOWELL, M., REINGOLD, A., GERSHMAN, K., MEEK, J., HADLER, J., ARNOLD, K. E., RYAN, P., LYNFIELD, R., MORIN, C., BAUMBACH, J., ZANSKY, S., BENNETT, N. M., THOMAS, A., SCHAFFNER, W., KIRSCHKE, D. & FINELLI, L. 2010. Influenza-associated pneumonia in children hospitalized with laboratory-confirmed influenza, 2003–2008. *Pediatr Infect Dis J*, 29, 585-90.
- DE JONG, N. W. M., VAN KESSEL, K. P. M. & VAN STRIJP, J. A. G. 2019. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr*, 7.
- DE LA CAMPA, A. G., GARCÍA, E., FENOLL, A. & MUÑOZ, R. 1997. Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb Drug Resist*, 3, 177-93.
- DE LAS RIVAS, B., GARCÍA, J. L., LÓPEZ, R. & GARCÍA, P. 2001. Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist*, 7, 213-22.

- DE LAS RIVAS, B., GARCÍA, J. L., LÓPEZ, R. & GARCÍA, P. 2002. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol*, 184, 4988-5000.
- DE MAESSCHALCK, V., GUTIÉRREZ, D., PAESHUYSE, J., LAVIGNE, R. & BRIERS, Y. 2020. Advanced engineering of third-generation lysins and formulation strategies for clinical applications. *Crit Rev Microbiol*, 46, 548-564.
- DE MIGUEL, S., DOMENECH, M., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., SEMPERE, J., VICIOSO, D., SANZ, J. C., GARCÍA COMAS, L., ARDANUY, C., FENOLL, A. & YUSTE, J. 2020. Nationwide trends of invasive pneumococcal disease in Spain from 2009 through 2019 in children and adults during the pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis*.
- DE MIGUEL, S., LATASA, P., YUSTE, J., GARCÍA, L., ORDOBÁS, M., RAMOS, B., PÉREZ, M., ORTIZ, M. A. & SANZ, J. C. 2021. Age-dependent serotype-associated case-fatality rate in invasive pneumococcal disease in the Autonomous Community of Madrid between 2007 and 2020. *Microorganism*, 9, 2286.
- DEJANA, E., ORSENIGO, F. & LAMPUGNANI, M. G. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 121, 2115-22.
- DEMAREST, S. J., SALBATO, J., ELIA, M., ZHONG, J., MORROW, T., HOLLAND, T., KLINE, K., WOODNUTT, G., KIMMEL, B. E. & HANSEN, G. 2005. Structural characterization of the cell wall binding domains of *Clostridium difficile* toxins A and B; evidence that  $Ca^{2+}$  plays a role in toxin A cell surface association. *J Mol Biol*, 346, 1197-206.
- DENNIS, E. A., COATS, M. T., GRIFFIN, S., PANG, B., BRILES, D. E., CRAIN, M. J. & SWORDS, W. E. 2018. Hyperencapsulated mucoid pneumococcal isolates from patients with cystic fibrosis have increased biofilm density and persistence *in vivo*. *Pathog Dis*, 76, , fty073.
- DI MARCO, F., BRAIDO, F., SANTUS, P., SCICHILONE, N. & BLASI, F. 2014. The role of cefditoren in the treatment of lower community-acquired respiratory tract infections (LRTIs): from bacterial eradication to reduced lung inflammation and epithelial damage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18, 321-32.
- DIEGELMANN, R. F. 2003. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen*, 11, 490-5.
- DIJLTJENS, L., APPERMANS, K., LISSENS, M., LORIES, B., KIM, W., VAN DER EYCKEN, E. V., FOSTER, K. R. & STEENACKERS, H. P. 2020. Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat Commun*, 11, 107.
- DÍEZ-MARTÍNEZ, R., DE PAZ, H. D., GARCÍA-FERNÁNDEZ, E., BUSTAMANTE, N., EULER, C. W., FISCHETTI, V. A., MENÉNDEZ, M. & GARCÍA, P. 2015. A novel chimeric phage lysin with high *in vitro* and *in vivo* bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 70, 1763-73.
- DÍEZ MARTÍNEZ, R. 2014. Estudios estructurales y funcionales de la lisozima Cpl-7, del bacteriófago Cp-7 de neumococo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- DINGES, M. M., ORWIN, P. M. & SCHLIEVERT, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13, 16-34.
- DINICOLA, S., DE GRAZIA, S., CARLOMAGNO, G. & PINTUCCI, J. P. 2014. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18, 2942-8.
- DOEHN, J. M., FISCHER, K., REPPE, K., GUTBIER, B., TSCHERNIG, T., HOCKE, A. C., FISCHETTI, V. A., LÖFFLER, J., SUTTORP, N., HIPPENSTIEL, S. & WITZENRATH, M. 2013. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother*, 68, 2111-7.
- DOMAGALA-KULAWIK, J. 2008. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 6, 19-34.
- DOMENECH, M. 2012. Biofilm de *Streptococcus pneumoniae*: genética, composición y terapia. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- DOMENECH, M., ARAÚJO-BAZÁN, L., GARCÍA, E. & MOSCOSO, M. 2014. *In vitro* biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* as a predictor of post-vaccination emerging serotypes colonizing the human nasopharynx. *Environ Microbiol*, 16, 1193-201.
- DOMENECH, M., DAMIÁN, D., ARDANUY, C., LIÑARES, J., FENOLL, A. & GARCÍA, E. 2015. Emerging, non-PCV13 serotypes 11A and 35B of *Streptococcus pneumoniae* show high potential for biofilm formation *in vitro*. *PLoS One*, 10, e0125636.

- DOMENECH, M. & GARCÍA, E. 2017. *N*-Acetyl-L-cysteine and Cysteamine as new strategies against mixed biofilms of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e01992-16.
- DOMENECH, M. & GARCÍA, E. 2018. Autolysin-independent DNA release in *Streptococcus pneumoniae* in vitro biofilms. *bioRxiv*, 322818.
- DOMENECH, M. & GARCÍA, E. 2020. The *N*-Acetylglucosaminidase LytB of *Streptococcus pneumoniae* is involved in the structure and formation of biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 86.
- DOMENECH, M., GARCÍA, E. & MOSCOSO, M. 2009. Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Environ Microbiol*, 11, 2542-55.
- DOMENECH, M., GARCÍA, E. & MOSCOSO, M. 2011. *In vitro* destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 4144-8.
- DOMENECH, M., GARCÍA, E. & MOSCOSO, M. 2012. Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Biotechnol*, 5, 455-65.
- DOMENECH, M., GARCÍA, E., PRIETO, A. & MOSCOSO, M. 2013a. Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ Microbiol*, 15, 502-16.
- DOMENECH, M., PEDRERO-VEGA, E., PRIETO, A. & GARCÍA, E. 2016. Evidence of the presence of nucleic acids and beta-glucan in the matrix of non-typeable *Haemophilus influenzae* in vitro biofilms. *Sci Rep*, 6, 36424.
- DOMENECH, M., RAMOS-SEVILLANO, E., GARCÍA, E., MOSCOSO, M. & YUSTE, J. 2013b. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 81, 2606-15.
- DOMENECH, M., SEMPERE, J., DE MIGUEL, S. & YUSTE, J. 2018. Combination of antibodies and antibiotics as a promising strategy against multidrug-resistant pathogens of the respiratory tract. *Front Immunol*, 9, 2700.
- DOMINIÁK, D. M., NIELSEN, J. L. & NIELSEN, P. H. 2011. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol*, 13, 710-21.
- DONELLI, G., FRANCOLINI, I., ROMOLI, D., GUAGLIANONE, E., PIOZZI, A., RAGUNATH, C. & KAPLAN, J. B. 2007. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2733-40.
- DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15, 167-93.
- DU, S., VILHENA, C., KING, S., SAHAGÚN-RUIZ, A., HAMMERSCHMIDT, S., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. 2021. Molecular analyses identifies new domains and structural differences among *Streptococcus pneumoniae* immune evasion proteins PspC and Hic. *Sci Rep*, 11, 1701.
- DUNNE, E. M., MURAD, C., SUDIGDOADI, S., FADLYANA, E., TARIGAN, R., INDRIYANI, S. A. K., PELL, C. L., WATTS, E., SATZKE, C., HINDS, J., DEWI, N. E., YANI, F. F., RUSMIL, K., MULHOLLAND, E. K. & KARTASASMITA, C. 2018. Carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Staphylococcus aureus* in Indonesian children: a cross-sectional study. *PLoS One*, 13, e0195098.
- DUNNE, E. M., SMITH-VAUGHAN, H. C., ROBINS-BROWNE, R. M., MULHOLLAND, E. K. & SATZKE, C. 2013. Nasopharyngeal microbial interactions in the era of pneumococcal conjugate vaccination. *Vaccine*, 31, 2333-42.
- DYE, J. A. & ADLER, K. B. 1994. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax*, 49, 825-34.
- DYKE, K. G., JEVONS, M. P. & PARKER, M. T. 1966. Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 1, 835-8.
- EBRUKE, C., DIONE, M. M., WALTER, B., WORWUI, A., ADEGBOLA, R. A., ROCA, A. & ANTONIO, M. 2016. High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonising the nasopharynx of Gambian villagers before widespread use of pneumococcal conjugate vaccines. *BMC Microbiol*, 16, 38.
- EHRlich, G. D., AHMED, A., EARL, J., HILLER, N. L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P., POST, J. C., DEMEO, P. & HU, F. Z. 2010. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution *in situ* during chronic bacterial biofilm infectious processes. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59, 269-79.
- EHRlich, G. D., HU, F. Z., SHEN, K., STOODLEY, P. & POST, J. C. 2005. Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin Orthop Relat Res*, 20-4.

- EL-AZIZI, M., RAO, S., KANCHANAPOOM, T. & KHARDORI, N. 2005. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 4, 2.
- EL ATROUNI, W. I., KNOLL, B. M., LAHR, B. D., ECKEL-PASSOW, J. E., SIA, I. G. & BADDOUR, L. M. 2009. Temporal trends in the incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Olmsted County, Minnesota, 1998 to 2005: a population-based study. *Clin Infect Dis*, 49, e130-8.
- ELWANY, S., GAMEA, M. A. & TALAAT, I. 2021. Passive smoking induces nasal biofilms in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 146, 110755.
- EMONTS, M., UITTERLINDEN, A. G., NOUWEN, J. L., KARDYS, I., MAAT, M. P., MELLES, D. C., WITTEMAN, J., JONG, P. T., VERBRUGH, H. A., HOFMAN, A., HERMANS, P. W. & BELKUM, A. 2008. Host polymorphisms in interleukin 4, complement factor H, and C-reactive protein associated with nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and occurrence of boils. *J Infect Dis*, 197, 1244-53.
- ENDO, Y., MATSUSHITA, M. & FUJITA, T. 2011. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 705-12.
- ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 144, 3049-60.
- ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7, 482-7.
- ERIKSEN, N. H., ESPERSEN, F., ROSDAHL, V. T. & JENSEN, K. 1995. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol Infect*, 115, 51-60.
- ESPOSITO, S., TERRANOVA, L., ZAMPIERO, A., IERARDI, V., RIOS, W. P., PELUCCHI, C. & PRINCIPI, N. 2014. Oropharyngeal and nasal *Staphylococcus aureus* carriage by healthy children. *BMC Infect Dis*, 14, 723.
- SPAGNOLO, F., TRUJILLO, M. & DENNEHY, J. J. 2021. Why do antibiotics exist?. *mBio*, 12, e01966-21.
- FAIRN, G. D. & GRINSTEIN, S. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol*, 33, 397-405.
- FALGARONE, G. & CHIOCCHIA, G. 2009. Clusterin: a multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv Cancer Res*, 104, 139-70.
- FALUGI, F., KIM, H. K., MISSIAKAS, D. M. & SCHNEEWIND, O. 2013. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 4, e00575-13.
- FAOAGALI, J. L., THONG, M. L. & GRANT, D. 1992. Ten years' experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large Australian hospital. *J Hosp Infect*, 20, 113-9.
- FARBER, B. F., KAPLAN, M. H. & CLOGSTON, A. G. 1990. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis*, 161, 37-40.
- FASCHING, C. E., GROSSMAN, T., CORTHÉSY, B., PLAUT, A. G., WEISER, J. N. & JANOFF, E. N. 2007. Impact of the molecular form of immunoglobulin A on functional activity in defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 75, 1801-10.
- FEIKIN, D. R., KAGUCIA, E. W., LOO, J. D., LINK-GELLES, R., PUHAN, M. A., CHERIAN, T., LEVINE, O. S., WHITNEY, C. G., O'BRIEN, K. L. & MOORE, M. R. 2013. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med*, 10, e1001517.
- FEIL, E. J., LI, B. C., AANENSEN, D. M., HANAGE, W. P. & SPRATT, B. G. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*, 186, 1518-30.
- FELDMAN, C., ANDERSON, R., COCKERAN, R., MITCHELL, T., COLE, P. & WILSON, R. 2002. The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. *Respir Med*, 96, 580-5.
- FELDMAN, C., MITCHELL, T. J., ANDREW, P. W., BOULNOIS, G. J., READ, R. C., TODD, H. C., COLE, P. J. & WILSON, R. 1990. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog*, 9, 275-84.
- FENG, Y., KONG, Y., BARNES, P. F., HUANG, F. F., KLUCAR, P., WANG, X., SAMTEN, B., SENGUPTA, M., MACHONA, B., DONIS, R., TVINNEREIM, A. R. & SHAMS, H. 2011. Exposure to cigarette smoke inhibits the pulmonary T-cell response to influenza virus and *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 79, 229-37.
- FENOLL, A., GRANIZO, J. J., AGUILAR, L., GIMÉNEZ, M. J., ARAGONESES-FENOLL, L., HANQUET, G., CASAL, J. & TARRAGÓ, D. 2009. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae*

- serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol*, 47, 1012-20.
- FENOLL, A., GRANIZO, J. J., GIMENEZ, M. J., YUSTE, J. & AGUILAR, L. 2015. Secular trends (1990–2013) in serotypes and associated non-susceptibility of *S. pneumoniae* isolates causing invasive disease in the pre-/post-era of pneumococcal conjugate vaccines in Spanish regions without universal paediatric pneumococcal vaccination. *Vaccine*, 33, 5691-9.
- FENOLL, A., JADO, I., VICIOSO, D. & CASAL, J. 1997. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol*, 35, 764-6.
- FENOLL, A., MARTÍN BOURGON, C., MUÑOZ, R., VICIOSO, D. & CASAL, J. 1991. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979–1989. *Rev Infect Dis*, 13, 56-60.
- FENOLL, A., MUÑOZ, R., GARCÍA, E. & DE LA CAMPA, A. G. 1994. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F<sub>0</sub> complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H<sup>+</sup>-ATPases. *Mol Microbiol*, 12, 587-98.
- FENTON, M., CASEY, P. G., HILL, C., GAHAN, C. G., ROSS, R. P., MCAULIFFE, O., O'MAHONY, J., MAHER, F. & COFFEY, A. 2010. The truncated phage lysin CHAP<sub>k</sub> eliminates *Staphylococcus aureus* in the nares of mice. *Bioeng Bugs*, 1, 404-7.
- FENTON, M., KEARY, R., MCAULIFFE, O., ROSS, R. P., O'MAHONY, J. & COFFEY, A. 2013. Bacteriophage-derived peptidase CHAP<sub>k</sub> eliminates and prevents staphylococcal biofilms. *Int J Microbiol*, 2013, 625341.
- FENTON, M., ROSS, R. P., MCAULIFFE, O., O'MAHONY, J. & COFFEY, A. 2011. Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP<sub>k</sub>. *J Appl Microbiol*, 111, 1025-35.
- FERNANDEZ-MARTINEZ, S., CORTES, X., BORRÁS-BLASCO, J., GRACIA-PÉREZ, A. & CASTERÁ, M. E. 2016. Effectiveness of a systematic vaccination program in patients with autoimmune inflammatory disease treated with anti-TNF alpha drugs. *Expert Opin Biol Ther*, 16, 1317-22.
- FIGUEIREDO, A. M. S., FERREIRA, F. A., BELTRAME, C. O. & CORTES, M. F. 2017. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit Rev Microbiol*, 43, 602-20.
- FISCHER, W., BEHR, T., HARTMANN, R., PETER-KATALINIĆ, J. & EGGE, H. 1993. Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem*, 215, 851-7.
- FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H. & O'GARA, J. P. 2005. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 43, 1973-6.
- FLACK, C. E., ZUREK, O. W., MEISHERY, D. D., PALLISTER, K. B., MALONE, C. L., HORSWILL, A. R. & VOYICH, J. M. 2014. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E2037-45.
- FLEISCHER, B. & SCHREZENMEIER, H. 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J Exp Med*, 167, 1697-707.
- FLEMING, D. & RUMBAUGH, K. 2018. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci Rep*, 8, 10738.
- FORSGREN, A. & SJÖQUIST, J. 1966. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human  $\gamma$ -globulin. *J Immunol*, 97, 822-7.
- FOURNIER, J.-M., HANNON, K., MOREAU, M., KARAKAWA, W. & VANN, W. Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 138, 561-7.
- FOURNIER, J.-M., VANN, W. F. & KARAKAWA, W. W. 1984. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 45, 87-93.
- FRANK, K. L. & PATEL, R. 2007. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun*, 75, 4728-42.
- FRIDKIN, S. K., HAGEMAN, J. C., MORRISON, M., SANZA, L. T., COMO-SABETTI, K., JERNIGAN, J. A., HARRIMAN, K., HARRISON, L. H., LYNFIELD, R. & FARLEY, M. M. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med*, 352, 1436-44.

- FROLET, C., BENIAZZA, M., ROUX, L., GALLET, B., NOIRCLERC-SAVOYE, M., VERNET, T. & DI GUILMI, A. M. 2010. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol*, 10, 190.
- FUJITA, T., MATSUSHITA, M. & ENDO, Y. 2004. The lectin-complement pathway—its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev*, 198, 185-202.
- GÁMEZ, G., CASTRO, A., GÓMEZ-MEJIA, A., GALLEGO, M., BEDOYA, A., CAMARGO, M. & HAMMERSCHMIDT, S. 2018. The variome of pneumococcal virulence factors and regulators. *BMC Genomics*, 19, 10.
- GANAIÉ, F., SAAD, J. S., MCGEE, L., VAN TONDER, A. J., BENTLEY, S. D., LO, S. W., GLADSTONE, R. A., TURNER, P., KEENAN, J. D., BREIMAN, R. F. & NAHM, M. H. 2020. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large *cps* fragment from an oral streptococcus. *mBio*, 11, e00937-20.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, L., HOLDEN, M. T., LINDSAY, H., WEBB, C. R., BROWN, D. F., CURRAN, M. D., WALPOLE, E., BROOKS, K., PICKARD, D. J., TEALE, C., PARKHILL, J., BENTLEY, S. D., EDWARDS, G. F., GIRVAN, E. K., KEARNS, A. M., PICHON, B., HILL, R. L., LARSEN, A. R., SKOV, R. L., PEACOCK, S. J., MASKELL, D. J. & HOLMES, M. A. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 11, 595-603.
- GARCÍA-GARCÍA, E. & ROSALES, C. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*, 72, 1092-108.
- GARCÍA, J., GARCÍA, E., SÁNCHEZ-PUELLES, J. & LÓPEZ, R. 1988. Identification of a lytic enzyme of *Clostridium acetobutylicum* that degrades choline-containing pneumococcal cell walls. *FEMS microbiology letters*, 52, 133-7.
- GARCÍA, P., GARCÍA, J. L., GARCÍA, E., SÁNCHEZ-PUELLES, J. M. & LÓPEZ, R. 1990. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene*, 86, 81-8.
- GARCÍA, P., GONZÁLEZ, M. P., GARCÍA, E., GARCÍA, J. L. & LÓPEZ, R. 1999. The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol*, 33, 128-38.
- GASC, A. M., KAUC, L., BARRAILLÉ, P., SICARD, M. & GOODGAL, S. 1991. Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 173, 7361-7.
- GBD 2018. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*, 18, 1191-10.
- GENO, K. A., GILBERT, G. L., SONG, J. Y., SKOVSTED, I. C., KLUGMAN, K. P., JONES, C., KONRADSEN, H. B. & NAHM, M. H. 2015. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev*, 28, 871-99.
- GEOGHEGAN, J. A., CORRIGAN, R. M., GRUSZKA, D. T., SPEZIALE, P., O'GARA, J. P., POTTS, J. R. & FOSTER, T. J. 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 192, 5663-73.
- GEORGE, S. E., NGUYEN, T., GEIGER, T., WEIDENMAIER, C., LEE, J. C., LIESE, J. & WOLZ, C. 2015. Phenotypic heterogeneity and temporal expression of the capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 98, 1073-88.
- GERBER, J. & NAU, R. 2010. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*, 23, 312-8.
- GESSNER, B. D., JIANG, Q., VAN WERKHOVEN, C. H., SINGS, H. L., WEBBER, C., SCOTT, D., NEUZIL, K. M., O'BRIEN, K. L., WUNDERINK, R. G., GROBBEE, D. E., BONTEN, M. J. M. & JODAR, L. 2019. A public health evaluation of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine impact on adult disease outcomes from a randomized clinical trial in the Netherlands. *Vaccine*, 37, 5777-87.
- GIGLI, I., FUJITA, T. & NUSSENZWEIG, V. 1979. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 6596-600.
- GILLET, Y., ISSARTEL, B., VANHEMS, P., FOURNET, J. C., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F., PIÉMONT, Y., BROUSSE, N., FLORET, D. & ETIENNE, J. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, 359, 753-9.
- GLIKMAN, D., DAGAN, R., BARKAI, G., AVERBUCH, D., GURI, A., GIVON-LAVI, N. & BEN-SHIMOL, S. 2018. Dynamics of severe and non-severe invasive pneumococcal disease in young children in Israel following PCV7/PCV13 Introduction. *Pediatr Infect Dis J*, 37, 1048-53.

- GLOVER, D. T., HOLLINGSHEAD, S. K. & BRILES, D. E. 2008. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infect Immun*, 76, 2767-76.
- GOLDEN, A. R., ADAM, H. J., ZHANEL, G. G. & CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE (CARA). 2016. Invasive *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 2011–2014: Characterization of new candidate 15-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes 22F and 33F. *Vaccine*, 34, 2527-30.
- GOLDEN, A. R., FEAR, T., BAXTER, M., ADAM, H. J., MARTIN, I., DEMCZUK, W., KARLOWSKY, J. A. & ZHANEL, G. G. 2021. Invasive pneumococcal disease caused by serotypes 22F and 33F in Canada: the SAVE study 2011–2018. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 101, 115447.
- GOLDSTEIN-DARUECH, N., COPE, E. K., ZHAO, K. Q., VUKOVIC, K., KOFONOW, J. M., DOGHRAMJI, L., GONZÁLEZ, B., CHIU, A. G., KENNEDY, D. W., PALMER, J. N., LEID, J. G., KREINDLER, J. L. & COHEN, N. A. 2011. Tobacco smoke mediated induction of sinonasal microbial biofilms. *PLoS One*, 6, e15700.
- GONZALEZ, B. E., HULTEN, K. G., LAMBERTH, L., KAPLAN, S. L. & MASON, E. O., JR. 2006. *Streptococcus pneumoniae* serogroups 15 and 33: an increasing cause of pneumococcal infections in children in the United States after the introduction of the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*, 25, 301-5.
- GOSINK, K. K., MANN, E. R., GUGLIELMO, C., TUOMANEN, E. I. & MASURE, H. R. 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 68, 5690-5.
- GOULD, I. M., DAVID, M. Z., ESPOSITO, S., GARAU, J., LINA, G., MAZZEI, T. & PETERS, G. 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 39, 96-104.
- GRAF, A. C., LEONARD, A., SCHÄUBLE, M., RIECKMANN, L. M., HOYER, J., MAASS, S., LALK, M., BECHER, D., PANÉ-FARRÉ, J. & RIEDEL, K. 2019. Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Mol Cell Proteomics*, 18, 1036-53.
- GRAM, C. J. F. D. M. 1884. Ueber die isolirte färbung der schizomyceten in schnitt-und trockenpräparaten. *Fortschr. Med.* 2:185-9.
- GRANIZO, J. J., GIMÉNEZ, M. J., BARBERÁN, J., CORONEL, P., GIMENO, M. & AGUILAR, L. 2006. The efficacy of cefditoren pivoxil in the treatment of lower respiratory tract infections, with a focus on the per-pathogen bacteriologic response in infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: a pooled analysis of seven clinical trials. *Clin Ther*, 28, 2061-9.
- GREENBERG, D., HOOVER, P. A., VESIKARI, T., PELTIER, C., HURLEY, D. C., MCFETRIDGE, R. D., DALLAS, M., HARTZEL, J., MARCHESE, R. D., COLLIER, B. G., STEK, J. E., ABEYGUNAWARDANA, C., WINTERS, M. A., MACNAIR, J. E., PUJAR, N. S. & MUSEY, L. 2018. Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants. *Vaccine*, 36, 6883-6891.
- GRIFFITH, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J Epidemiology Infection*, 27, 113-159.
- GROSS, M., CRAMTON, S. E., GÖTZ, F. & PESCHEL, A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun*, 69, 3423-6.
- GRUMANN, D., NÜBEL, U. & BRÖKER, B. M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics. *Infect Genet Evol*, 21, 583-92.
- GRUMANN, D., RUOTSALAINEN, E., KOLATA, J., KUUSELA, P., JÄRVINEN, A., KONTINEN, V. P., BRÖKER, B. M. & HOLTFRETER, S. 2011. Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Vaccine Immunol*, 18, 487-93.
- GRUNDMANN, H., AANENSEN, D. M., VAN DEN WIJNGAARD, C. C., SPRATT, B. G., HARMSSEN, D. & FRIEDRICH, A. W. 2010. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med*, 7, e1000215.
- GUIRAL, S., MITCHELL, T. J., MARTIN, B. & CLAVERY, J. P. 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8710-5.
- GUO, W., QUAH, S. Y., LIM, K. C., YU, V. S. & TAN, K. S. 2016. Cysteamine enhances biofilm eradication efficacy of calcium hydroxide. *J Endod*, 42, 742-6.
- HALL-STOODLEY, L., HU, F. Z., GIESEKE, A., NISTICO, L., NGUYEN, D., HAYES, J., FORBES, M., GREENBERG, D. P., DICE, B., BURROWS, A., WACKYM, P. A., STOODLEY, P., POST, J. C.,

- EHRlich, G. D. & KERSCHNER, J. E. 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*, 296, 202-11.
- HALL, L. M., WHILEY, R. A., DUKE, B., GEORGE, R. C. & EFSTRATIOU, A. 1996. Genetic relatedness within and between serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from the United Kingdom: analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance patterns. *J Clin Microbiol*, 34, 853-9.
- HAMILOS, D. L. 2019. Biofilm formations in pediatric respiratory tract infection. Part 1: Biofilm structure, role of innate immunity in protection against and response to biofilm, methods of biofilm detection, pediatric respiratory tract diseases associated with mucosal biofilm formation. *Curr Infect Dis Rep*, 21, 6.
- HAMMEL, M., SFYROERA, G., PYRPASSOPOULOS, S., RICKLIN, D., RAMYAR, K. X., POP, M., JIN, Z., LAMBRIS, J. D. & GEISBRECHT, B. V. 2007a. Characterization of Ehp, a secreted complement inhibitory protein from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 282, 30051-61.
- HAMMEL, M., SFYROERA, G., RICKLIN, D., MAGOTTI, P., LAMBRIS, J. D. & GEISBRECHT, B. V. 2007b. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol*, 8, 430-7.
- HAMMERSCHMIDT, S., AGARWAL, V., KUNERT, A., HAELBICH, S., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. 2007. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol*, 178, 5848-58.
- HAMMERSCHMIDT, S., BETHE, G., REMANE, P. H. & CHHATWAL, G. S. 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 67, 1683-7.
- HAMMERSCHMIDT, S., TALAY, S. R., BRANDTZAEG, P. & CHHATWAL, G. S. 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol*, 25, 1113-24.
- HAMMERSCHMIDT, S., TILLIG, M. P., WOLFF, S., VAERMAN, J. P. & CHHATWAL, G. S. 2000. Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol*, 36, 726-36.
- HAMMERSCHMIDT, S., WOLFF, S., HOCKE, A., ROSSEAU, S., MÜLLER, E. & ROHDE, M. 2005. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, 73, 4653-67.
- HANAGE, W. P., FRASER, C. & SPRATT, B. G. 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 1917-27.
- HANKE, M. L., HEIM, C. E., ANGLE, A., SANDERSON, S. D. & KIELIAN, T. 2013. Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infections. *J Immunol*, 190, 2159-68.
- HANSMAN, D. & BULLEN, M. 1967. A resistant pneumococcus. *Lancet*, 290, 264-5.
- HARKINS, C. P., PICHON, B., DOUMITH, M., PARKHILL, J., WESTH, H., TOMASZ, A., DE LENCASTRE, H., BENTLEY, S. D., KEARNS, A. M. & HOLDEN, M. T. G. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol*, 18, 130.
- HARRIOTT, M. M. & NOVERR, M. C. 2011. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol*, 19, 557-63.
- HARRIS, L. G., FOSTER, S. J. & RICHARDS, R. G. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater*, 4, 39-60.
- HARTMAN, B. J. & TOMASZ, A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 158, 513-6.
- HATHAWAY, L. J., BRUGGER, S. D., MORAND, B., BANGERT, M., ROTZETTER, J. U., HAUSER, C., GRABER, W. A., GORE, S., KADIOGLU, A. & MUHLEMANN, K. 2012. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. *PLoS Pathog*, 8, e1002574.
- HAUPT, K., REUTER, M., VAN DEN ELSEN, J., BURMAN, J., HÄLBICH, S., RICHTER, J., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. 2008. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. *PLoS Pathog*, 4, e1000250.

- HÅVARSTEIN, L. S., COOMARASWAMY, G. & MORRISON, D. A. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11140-4.
- HAYWARD, S., THOMPSON, L. A. & MCEACHERN, A. 2016. Is 13-Valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) combined with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23) superior to PPSV23 alone for reducing incidence or severity of pneumonia in older adults? *A Clin-IQ. J Patient Cent Res Rev*, 3, 111-115.
- HEESTERBEEK, D. A. C., ANGELIER, M. L., HARRISON, R. A. & ROOIJAKKERS, S. H. M. 2018. Complement and bacterial infections: from molecular mechanisms to therapeutic applications. *J Innate Immun*, 10, 455-464.
- HEIDELBERGER, M. & AVERY, O. T. 1923. The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med*, 38, 73-9.
- HEIDELBERGER, M. & AVERY, O. T. 1924. The soluble specific substance of pneumococcus. Second paper. *J Exp Med*, 40, 301-17.
- HEIDELBERGER, M., GOEBEL, W. F. & AVERY, O. T. 1925. The soluble specific substance of pneumococcus. Third paper. *J Exp Med*, 42, 727-45.
- HENDRICKX, A. P., BUDZIK, J. M., OH, S. Y. & SCHNEEWIND, O. 2011. Architects at the bacterial surface—sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat Rev Microbiol*, 9, 166-76.
- HENRIQUES-NORMARK, B. & TUOMANEN, E. I. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3.
- HERBERT, S., WORLITZSCH, D., DASSY, B., BOUTONNIER, A., FOURNIER, J-M., BELLON, G., DALHOFF, A. & DÖRING, G. 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO<sub>2</sub> inhibition in vitro and in vivo. *J Infect Dis*, 176, 431-8.
- HERMOSO, J. A., LAGARTERA, L., GONZÁLEZ, A., STELTER, M., GARCÍA, P., MARTÍNEZ-RIPOLL, M., GARCÍA, J. L. & MENÉNDEZ, M. 2005. Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 533-8.
- HERRON, M. J., NELSON, C. M., LARSON, J., SNAPP, K. R., KANSAS, G. S. & GOODMAN, J. L. 2000. Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science*, 288, 1653-6.
- HILLER, N. L., AHMED, A., POWELL, E., MARTIN, D. P., EUTSEY, R., EARL, J., JANTO, B., BOISSY, R. J., HOGG, J., BARBADORA, K., SAMPATH, R., LONERGAN, S., POST, J. C., HU, F. Z. & EHRLICH, G. D. 2010. Generation of genic diversity among *Streptococcus pneumoniae* strains via horizontal gene transfer during a chronic polyclonal pediatric infection. *PLoS Pathog*, 6, e1001108.
- HO, J. G., GRECO, A., RUPNIK, M. & NG, K. K. 2005. Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18373-8.
- HOA, M., TOMOVIC, S., NISTICO, L., HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P., SACHDEVA, L., BERK, R. & COTICCHIA, J. M. 2009. Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 73, 1242-8.
- HÖFFLER, U., BULANDA, M., HECZKO, P. B. & PULVERER, G. 1978. A comparison of staphylococcal nasal carrier rates in Germany and Poland. *Med Microbiol Immunol*, 164, 285-90.
- HOGAN, D. & KOLTER, R. 2002. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr Opin Microbiol*, 5, 472-7.
- HOGAN, S., ZAPOTOCZNA, M., STEVENS, N. T., HUMPHREYS, H., O'GARA, J. P. & O'NEILL, E. 2017. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *J Hosp Infect*, 96, 177-82.
- HØIBY, N., KROGH JOHANSEN, H., MOSER, C., SONG, Z., CIOFU, O. & KHARAZMI, A. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect*, 3, 23-35.
- HOLERS, V. M. 2014. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol*, 32, 433-59.
- HOLLINGSHEAD, S. K., BECKER, R. & BRILES, D. E. 2000. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 68, 5889-900.
- HOLTFRETER, S. & BRÖKER, B. M. 2005. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53, 13-27.

- HÖLTJE, J. V. & TOMASZ, A. 1974. Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J Biol Chem*, 249, 7032-4.
- HORSBURGH, M. J., AISH, J. L., WHITE, I. J., SHAW, L., LITHGOW, J. K. & FOSTER, S. J. 2002.  $\sigma^B$  modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol*, 184, 5457-67.
- HOUSTON, P., ROWE, S. E., POZZI, C., WATERS, E. M. & O'GARA, J. P. 2011. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun*, 79, 1153-65.
- HU, F. Z., KROL, J. E., TSAI, C. H. S., EUTSEY, R. A., HILLER, L. N., SEN, B., AHMED, A., HILLMAN, T., BUCHINSKY, F. J., NISTICO, L., DICE, B., LONGWELL, M., HORSEY, E. & EHRlich, G. D. 2019. Deletion of genes involved in the ketogluconate metabolism, Entner-Doudoroff pathway, and glucose dehydrogenase increase local and invasive virulence phenotypes in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 14, e0209688.
- HURLEY, D., GRIFFIN, C., YOUNG, M., SCOTT, D. A., PRIDE, M. W., SCULLY, I. L., GINIS, J., SEVERS, J., JANSEN, K. U., GRUBER, W. C. & WATSON, W. 2021. Safety, tolerability, and immunogenicity of a 20-Valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV20) in adults 60 to 64 years of age. *Clin Infect Dis*, 73, e1489-e1497.
- HUSS, A., SCOTT, P., STUCK, A. E., TROTTER, C. & EGGER, M. 2009. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ*, 180, 48-58.
- HUSSAIN, M., MELEGARO, A., PEBODY, R. G., GEORGE, R., EDMUNDS, W. J., TALUKDAR, R., MARTIN, S. A., EFSTRATIOU, A. & MILLER, E. 2005. A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiol Infect*, 133, 891-8.
- HUTCHERSON, J. A., SCOTT, D. A. & BAGAITKAR, J. 2015. Scratching the surface—tobacco-induced bacterial biofilms. *Tob Induc Dis*, 13, 1.
- HUVENNE, W., LANCKACKER, E. A., KRYSKO, O., BRACKE, K. R., DEMOOR, T., HELLINGS, P. W., BRUSSELLE, G. G., JOOS, G. F., BACHERT, C. & MAES, T. 2011. Exacerbation of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in mice. *Respir Res*, 12, 69.
- HYAMS, C., CAMBERLEIN, E., COHEN, J. M., BAX, K. & BROWN, J. S. 2010a. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun*, 78, 704-15.
- HYAMS, C., OPEL, S., HANAGE, W., YUSTE, J., BAX, K., HENRIQUES-NORMARK, B., SPRATT, B. G. & BROWN, J. S. 2011. Effects of *Streptococcus pneumoniae* strain background on complement resistance. *PLoS One*, 6, e24581.
- HYAMS, C., YUSTE, J., BAX, K., CAMBERLEIN, E., WEISER, J. N. & BROWN, J. S. 2010b. *Streptococcus pneumoniae* resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. *Infect Immun*, 78, 716-25.
- IP, W. K., TAKAHASHI, K., EZEKOWITZ, R. A. & STUART, L. M. 2009. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev*, 230, 9-21.
- ITO, T. 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 4961-7.
- ITO, T., HIRAMATSU, K., TOMASZ, A., DE LENCASTRE, H., PERRETEN, V., HOLDEN, M. T., COLEMAN, D. C., GOERING, R., GIFFARD, P. M., SKOV, R. L., ZHANG, K., WESTH, H., O'BRIEN, F., TENOVER, F. C., OLIVEIRA, D. C., BOYLE-VAVRA, S., LAURENT, F., KEARNS, A. M., KREISWIRTH, B., KO, K. S., GRUNDMANN, H., SOLLID, J. E., JOHN, J. F., JR., DAUM, R., SODERQUIST, B. & BUIST, G. 2012. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 4997-9.
- ITOH, S., HAMADA, E., KAMOSHIDA, G., YOKOYAMA, R., TAKII, T., ONOZAKI, K. & TSUJI, T. 2010. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. *Mol Immunol*, 47, 932-8.
- IVERSON, A., MEYER, C. J., VOGEL, P., WAIDYARACHCHI, S., DAS, N., BRUHN, D. F., POOLE, A., BUTLER, M. M., BOWLIN, T. L., LEE, R. E. & ROSCH, J. W. 2019. Efficacy of aminomethyl spectinomycins against complex upper respiratory tract bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 63, e02096-18.

- IZANO, E. A., AMARANTE, M. A., KHER, W. B. & KAPLAN, J. B. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 74, 470-6.
- JACKSON, L. A., NEUZIL, K. M., YU, O., BENSON, P., BARLOW, W. E., ADAMS, A. L., HANSON, C. A., MAHONEY, L. D., SHAY, D. K. & THOMPSON, W. W. 2003. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N Engl J Med*, 348, 1747-55.
- JACOBS, M. R., GOOD, C. E., BAJAKSOUZIAN, S. & WINDAU, A. R. 2008. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A, 6C, and 22F and serogroup 15 in Cleveland, Ohio, in relation to introduction of the protein-conjugated pneumococcal vaccine. *Clin Infect Dis*, 47, 1388-95.
- JACOBY, P., WATSON, K., BOWMAN, J., TAYLOR, A., RILEY, T. V., SMITH, D. W. & LEHMANN, D. 2007. Modelling the co-occurrence of *Streptococcus pneumoniae* with other bacterial and viral pathogens in the upper respiratory tract. *Vaccine*, 25, 2458-64.
- JADO, I., LÓPEZ, R., GARCÍA, E., FENOLL, A., CASAL, J. & GARCÍA, P. 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother*, 52, 967-73.
- JANOFF, E. N., FASCHING, C., ORENSTEIN, J. M., RUBINS, J. B., OPSTAD, N. L. & DALMASSO, A. P. 1999. Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *J Clin Invest*, 104, 1139-47.
- JANULCZYK, R., IANNELLI, F., SJOHOLM, A. G., POZZI, G. & BJORCK, L. 2000. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem*, 275, 37257-63.
- JARRAUD, S., MOUGEL, C., THIOULOUSE, J., LINA, G., MEUGNIER, H., FOREY, F., NESME, X., ETIENNE, J. & VANDENESCH, F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*, 70, 631-41.
- JARVA, H., JANULCZYK, R., HELLWAGE, J., ZIPFEL, P. F., BJÖRCK, L. & MERI, S. 2002. *Streptococcus pneumoniae* evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the pspC locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8–11 of factor H. *J Immunol*, 168, 1886-94.
- JEDRZEJAS, M. J. 2006. Unveiling molecular mechanisms of pneumococcal surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clin Chim Acta*, 367, 1-10.
- JEDRZEJAS, M. J. 2007. Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2799-822.
- JEFFERSON, K. K., GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 2467-73.
- JEFFERSON, K. K., PIER, D. B., GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 2004. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 186, 2449-56.
- JEVONS, M. P. 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. *BMJ*, 1, 124.
- JI, G., BEAVIS, R. & NOVICK, R. P. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, 276, 2027-30.
- JOHNSTON, J. W., MYERS, L. E., OCHS, M. M., BENJAMIN, W. H., JR., BRILES, D. E. & HOLLINGSHEAD, S. K. 2004. Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect Immun*, 72, 5858-67.
- JOINER, K. A. 1985. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing and on the mechanism of action of bactericidal antibody. *Curr Top Microbiol Immunol*, 121, 99-133.
- JOLLEY, K. A., BRAY, J. E. & MAIDEN, M. C. J. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3, 124.
- JONGERIUS, I., GARCIA, B. L., GEISBRECHT, B. V., VAN STRIJP, J. A. G. & ROOIJAKKERS, S. H. M. 2010. Convertase inhibitory properties of staphylococcal extracellular complement-binding protein. *J Biol Chem*, 285, 14973-9.
- JONGERIUS, I., KÖHL, J., PANDEY, M. K., RUYKEN, M., VAN KESSEL, K. P., VAN STRIJP, J. A. & ROOIJAKKERS, S. H. 2007. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med*, 204, 2461-71.
- JOSHI, T., BUTCHAR, J. P. & TRIDANDAPANI, S. 2006. Fcγ receptor signaling in phagocytes. *Int J Hematol*, 84, 210-6.

- JOURDAIN, S., SMEESTERS, P. R., DENIS, O., DRAMAIX, M., SPUTAEL, V., MALAVIOLLE, X., VAN MELDEREN, L. & VERGISON, A. 2011. Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. *Clin Microbiol Infect*, 17, 907-14.
- JOYCE, J. G., ABEYGUNAWARDANA, C., XU, Q., COOK, J. C., HEPLER, R., PRZYSIECKI, C. T., GRIMM, K. M., ROPER, K., IP, C. C., COPE, L., MONTGOMERY, D., CHANG, M., CAMPBELL, S., BROWN, M., MCNEELY, T. B., ZORMAN, J., MAIRA-LITRÁN, T., PIER, G. B., KELLER, P. M., JANSEN, K. U. & MARK, G. E. 2003. Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res*, 338, 903-22.
- JUN, S. Y., JANG, I. J., YOON, S., JANG, K., YU, K. S., CHO, J. Y., SEONG, M. W., JUNG, G. M., YOON, S. J. & KANG, S. H. 2017. Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e02629-16.
- JUNGES, R., SALVADORI, G., SHEKHAR, S., ÅMDAL, H. A., PERISELNERIS, J. N., CHEN, T., BROWN, J. S. & PETERSEN, F. C. 2017. A quorum-sensing system that regulates *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and surface polysaccharide production. *mSphere*, 2, e00324-17.
- KAASCH, A. J., BARLOW, G., EDGEWORTH, J. D., FOWLER, V. G., JR., HELLMICH, M., HOPKINS, S., KERN, W. V., LLEWELYN, M. J., RIEG, S., RODRIGUEZ-BAÑO, J., SCARBOROUGH, M., SEIFERT, H., SORIANO, A., TILLEY, R., TÖRÖK, M. E., WEIß, V., WILSON, A. P. & THWAITES, G. E. 2014. *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a pooled analysis of five prospective, observational studies. *J Infect*, 68, 242-51.
- KADIOGLU, A., WEISER, J. N., PATON, J. C. & ANDREW, P. W. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*, 6, 288-301.
- KAMERLING, J. P. 1999. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view 81-114. In: A. T. (ed.) *Streptococcus pneumoniae: molecular biology & mechanisms of disease*. Mary Ann Liebert, Inc, Larchmont, NY.
- KANG, M., KO, Y. P., LIANG, X., ROSS, C. L., LIU, Q., MURRAY, B. E. & HÖÖK, M. 2013. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem*, 288, 20520-31.
- KANG, Y. H., TAN, L. A., CARROLL, M. V., GENTLE, M. E. & SIM, R. B. 2009. Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways. *Adv Exp Med Biol*, 653, 117-28.
- KAPLAN, S. L., BARSON, W. J., LIN, P. L., ROMERO, J. R., BRADLEY, J. S., TAN, T. Q., HOFFMAN, J. A., GIVNER, L. B. & MASON, E. O., JR. 2013. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*, 32, 203-7.
- KARAKAWA, W., FOURNIER, J., VANN, W., ARBEIT, R., SCHNEERSON, R. & ROBBINS, J. 1985. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Journal of clinical microbiology*, 22, 445-7.
- KATAYAMA, Y., BABA, T., SEKINE, M., FUKUDA, M. & HIRAMATSU, K. 2013. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 195, 1194-203.
- KATAYAMA, Y., ITO, T. & HIRAMATSU, K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1549-55.
- KAUSMALLY, L., JOHNSBORG, O., LUNDE, M., KNUTSEN, E. & HÅVARSTEIN, L. S. 2005. Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol*, 187, 4338-45.
- KAVANAUGH, J. S., FLACK, C. E., LISTER, J., RICKER, E. B., IBBERSON, C. B., JENUL, C., MOORMEIER, D. E., DELMAIN, E. A., BAYLES, K. W. & HORSWILL, A. R. 2019. Identification of extracellular DNA-binding proteins in the biofilm matrix. *mBio*, 10, e01137-19.
- KEINHÖRSTER, D., GEORGE, S. E., WEIDENMAIER, C. & WOLZ, C. 2019. Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides. *Int J Med Microbiol*, 309, 151333.
- KERR, A. R., PATERSON, G. K., MCCLUSKEY, J., IANNELLI, F., OGGIONI, M. R., POZZI, G. & MITCHELL, T. J. 2006. The contribution of PspC to pneumococcal virulence varies between

- strains and is accomplished by both complement evasion and complement-independent mechanisms. *Infect Immun*, 74, 5319-24.
- KHAN, F., WU, X., MATZKIN, G. L., KHAN, M. A., SAKAI, F. & VIDAL, J. E. 2016. *Streptococcus pneumoniae* eradicates preformed *Staphylococcus aureus* biofilms through a mechanism requiring physical contact. *Front Cell Infect Microbiol*, 6, 104.
- KHARAT, A. S. & TOMASZ, A. 2006. Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol Microbiol*, 60, 93-107.
- KIEDROWSKI, M. R., KAVANAUGH, J. S., MALONE, C. L., MOOTZ, J. M., VOYICH, J. M., SMELTZER, M. S., BAYLES, K. W. & HORSWILL, A. R. 2011. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 6, e26714.
- KIM, J. O., ROMERO-STEINER, S., SØRENSEN, U. B., BLOM, J., CARVALHO, M., BARNARD, S., CARLONE, G. & WEISER, J. N. 1999. Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 67, 2327-33.
- KIM, J. O. & WEISER, J. N. 1998. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 177, 368-77.
- KING, S. J., HIPPE, K. R. & WEISER, J. N. 2006. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 59, 961-74.
- KIRBY, W. M. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, 99, 452-3.
- KLEIN, E. 1884. *Micro-organisms and disease*, Practitioner, XXXII, 321-52..
- KLOOS, W. E. 1986. *Staphylococcus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 1013-1035.
- KLUYTMANS, J., VAN BELKUM, A. & VERBRUGH, H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, 10, 505-20.
- KO, Y. P., KUIPERS, A., FREITAG, C. M., JONGERIUS, I., MEDINA, E., VAN ROOIJEN, W. J., SPAAN, A. N., VAN KESSEL, K. P., HÖÖK, M. & ROOIJAKKERS, S. H. 2013. Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. *PLoS Pathog*, 9, e1003816.
- KOEDEL, U., SCHELD, W. M. & PFISTER, H. W. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*, 2, 721-36.
- KOGAN, G., SADOVSKAYA, I., CHAIGNON, P., CHOKR, A. & JABBOURI, S. 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett*, 255, 11-6.
- KOHLER, S., HALLSTRÖM, T., SINGH, B., RIESBECK, K., SPARTÀ, G., ZIPFEL, P. F. & HAMMERSCHMIDT, S. 2015. Binding of vitronectin and Factor H to Hic contributes to immune evasion of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *Thromb Haemost*, 113, 125-42.
- KONDOS, S. C., HATFALUDI, T., VOSKOBOINIK, I., TRAPANI, J. A., LAW, R. H., WHISSTOCK, J. C. & DUNSTONE, M. A. 2010. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens*, 76, 341-51.
- KOS, V. N., DESJARDINS, C. A., GRIGGS, A., CERQUEIRA, G., VAN TONDER, A., HOLDEN, M. T., GODFREY, P., PALMER, K. L., BODI, K., MONGODIN, E. F., WORTMAN, J., FELDGARDEN, M., LAWLEY, T., GILL, S. R., HAAS, B. J., BIRREN, B. & GILMORE, M. S. 2012. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. *mBio*, 3, e00112-12.
- KRISTIAN, S. A., BIRKENSTOCK, T. A., SAUDER, U., MACK, D., GÖTZ, F. & LANDMANN, R. 2008. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis*, 197, 1028-35.
- KRONE, C. L., VAN DE GROEP, K., TRZCINSKI, K., SANDERS, E. A. & BOGAERT, D. 2014. Immunosenescence and pneumococcal disease: an imbalance in host-pathogen interactions. *Lancet Respir Med*, 2, 141-53.
- KUEHNERT, M. J., KRUSZON-MORAN, D., HILL, H. A., MCQUILLAN, G., MCALLISTER, S. K., FOSHEIM, G., MCDOUGAL, L. K., CHAITRAM, J., JENSEN, B., FRIDKIN, S. K., KILLGORE, G. &

- TENOVER, F. C. 2006. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *J Infect Dis*, 193, 172-9.
- KUIPERS, A., STAPELS, D. A. C., WEERWIND, L. T., KO, Y. P., RUYKEN, M., LEE, J. C., VAN KESSEL, K. P. M. & ROOIJAKKERS, S. H. M. 2016. The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology*, 162, 1185-1194.
- KULKARNI, H. S., LISZEWSKI, M. K., BRODY, S. L. & ATKINSON, J. P. 2018. The complement system in the airway epithelium: an overlooked host defense mechanism and therapeutic target? *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1582-6.
- KULKARNI, R., ANTALA, S., WANG, A., AMARAL, F. E., RAMPERSAUD, R., LARUSSA, S. J., PLANET, P. J. & RATNER, A. J. 2012. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress. *Infect Immun*, 80, 3804-11.
- KULKARNI, R., CASKEY, J., SINGH, S. K., PAUDEL, S., BARAL, P., SCHEXNAYDER, M., KIM, J., KIM, N., KOSMIDER, B., RATNER, A. J. & JEYASEELAN, S. 2016. Cigarette smoke extract-exposed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* regulates leukocyte function for pulmonary persistence. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 55, 586-601.
- KUNDUKAD, B., SCHUSSMAN, M., YANG, K., SEVIOUR, T., YANG, L., RICE, S. A., KJELLEBERG, S. & DOYLE, P. S. 2017. Mechanistic action of weak acid drugs on biofilms. *Sci Rep*, 7, 4783.
- KUSUMA, C., JADANOVA, A., CHANTURIYA, T. & KOKAI-KUN, J. F. 2007. Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 475-82.
- LAAN, M., BOZINOVSKI, S. & ANDERSON, G. P. 2004. Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 173, 4164-70.
- LAARMAN, A. J., RUYKEN, M., MALONE, C. L., VAN STRIJP, J. A., HORSWILL, A. R. & ROOIJAKKERS, S. H. 2011. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol*, 186, 6445-53.
- LACOMA, A., EDWARDS, A. M., YOUNG, B. C., DOMÍNGUEZ, J., PRAT, C. & LAABELI, M. 2019. Cigarette smoke exposure redirects *Staphylococcus aureus* to a virulence profile associated with persistent infection. *Sci Rep*, 9, 10798.
- LADHANI, S. 2001. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clin Microbiol Infect*, 7, 301-7.
- LADHANI, S. & GARBASH, M. 2005. Staphylococcal skin infections in children: rational drug therapy recommendations. *Paediatr Drugs*, 7, 77-102.
- LADHANI, S. N., ANDREWS, N. J., WAIGHT, P., BORROW, R., SLACK, M. P. & MILLER, E. 2013. Impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in infants younger than 90 days in England and Wales. *Clin Infect Dis*, 56, 633-40.
- LADHANI, S. N., COLLINS, S., DJENNAD, A., SHEPPARD, C. L., BORROW, R., FRY, N. K., ANDREWS, N. J., MILLER, E. & RAMSAY, M. E. 2018. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 18, 441-51.
- LAM, J. S., MACDONALD, L. A. & LAM, M. Y. 1987. Production of monoclonal antibodies against serotype strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 55, 2854-6.
- LANGLEY, R., WINES, B., WILLOUGHBY, N., BASU, I., PROFT, T. & FRASER, J. D. 2005. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-FcR1 binding and serum killing of bacteria. *J Immunol*, 174, 2926-33.
- LARSEN, M. V., HARBOE, Z. B., LADELUND, S., SKOV, R., GERSTOFT, J., PEDERSEN, C., LARSEN, C. S., OBEL, N., KRONBORG, G. & BENFIELD, T. 2012. Major but differential decline in the incidence of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in HIV-infected individuals from 1995 to 2007: a nationwide cohort study. *HIV Med*, 13, 45-53.
- LARSON, T.R. & YOTHER, J. 2017. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide is linked to peptidoglycan via a direct glycosidic bond to  $\beta$ -D- N-acetylglucosamine. *PNAS*, 22, 5695-700.
- LATTAR, S. M., TUCHSCHERR, L. P., CACCURI, R. L., CENTRÓN, D., BECKER, K., ALONSO, C. A., BARBERIS, C., MIRANDA, G., BUZZOLA, F. R., VON EIFF, C. & SORDELLI, D. O. 2009. Capsule expression and genotypic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic or acute osteomyelitis. *Infect Immun*, 77, 1968-75.

- LAU, G. W., HAATAJA, S., LONETTO, M., KENSIT, S. E., MARRA, A., BRYANT, A. P., MCDEVITT, D., MORRISON, D. A. & HOLDEN, D. W. 2001. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol*, 40, 555-71.
- LAUDERDALE, K. J., MALONE, C. L., BOLES, B. R., MORCUENDE, J. & HORSWILL, A. R. 2010. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res*, 28, 55-61.
- LAUFER, A. S., THOMAS, J. C., FIGUEIRA, M., GENT, J. F., PELTON, S. I. & PETTIGREW, M. M. 2010. Capacity of serotype 19A and 15B/C *Streptococcus pneumoniae* isolates for experimental otitis media: implications for the conjugate vaccine. *Vaccine*, 28, 2450-7.
- LAUPLAND, K. B., LYYTIKÄINEN, O., SØGAARD, M., KENNEDY, K. J., KNUDSEN, J. D., OSTERGAARD, C., GALBRAITH, J. C., VALIQUETTE, L., JACOBSSON, G., COLLIGNON, P. & SCHØNHEYDER, H. C. 2013. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*, 19, 465-71.
- LAUPLAND, K. B., ROSS, T. & GREGSON, D. B. 2008. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000–2006. *J Infect Dis*, 198, 336-43.
- LE, K. Y. & OTTO, M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol*, 6, 1174.
- LEACH, A. J., WIGGER, C., BEISSBARTH, J., WOLTRING, D., ANDREWS, R., CHATFIELD, M. D., SMITH-VAUGHAN, H. & MORRIS, P. S. 2016. General health, otitis media, nasopharyngeal carriage and middle ear microbiology in Northern Territory Aboriginal children vaccinated during consecutive periods of 10-valent or 13-valent pneumococcal conjugate vaccines. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 86, 224-32.
- LECLERCQ, R. & COURVALIN, P. 2002. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2727-34.
- LEE, A. S., DE LENCASTRE, H., GARAU, J., KLUYTMANS, J., MALHOTRA-KUMAR, S., PESCHEL, A. & HARBARTH, S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 18033.
- LEE, C. Y., SCHMIDT, J. J., JOHNSON-WINEGAR, A. D., SPERO, L. & IANDOLO, J. J. 1987. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 169, 3904-9.
- LEE, G. M., HUANG, S. S., RIFAS-SHIMAN, S. L., HINRICHSEN, V. L., PELTON, S. I., KLEINMAN, K., HANAGE, W. P., LIPSITCH, M., MCADAM, A. J. & FINKELSTEIN, J. A. 2009. Epidemiology and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in children in the post-PCV7 era. *BMC Infect Dis*, 9, 110.
- LEE, J. C., TAKEDA, S., LIVOLSI, P. J. & PAOLETTI, L. C. 1993. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 61, 1853-8.
- LEE, L. Y., HÖÖK, M., HAVILAND, D., WETSEL, R. A., YONTER, E. O., SYRIBEYS, P., VERNACHIO, J. & BROWN, E. L. 2004. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis*, 190, 571-9.
- LEFEVRE, J. C., FAUCON, G., SICARD, A. M. & GASC, A. M. 1993. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 31, 2724-8.
- LEID, J. G., SHIRTLIFF, M. E., COSTERTON, J. W. & STOODLEY, P. 2002. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun*, 70, 6339-45.
- LEID, J. G., WILLSON, C. J., SHIRTLIFF, M. E., HASSETT, D. J., PARSEK, M. R. & JEFFERS, A. K. 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage killing. *J Immunol*, 175, 7512-8.
- LEMON, K. P., KLEPAC-CERAJ, V., SCHIFFER, H. K., BRODIE, E. L., LYNCH, S. V. & KOLTER, R. 2010. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *mBio*, 1, e00129-10.
- LEVY, C., OULDALI, N., CAEYMAEX, L., ANGOULVANT, F., VARON, E. & COHEN, R. 2019. Diversity of serotype replacement after pneumococcal conjugate vaccine implementation in Europe. *J Pediatr*, 213, 252-3.
- LEWNARD, J. A., BRUXVOORT, K. J., FISCHER, H., HONG, V. X., GRANT, L. R., JÓDAR, L., GESSNER, B. D. & TARTOF, S. Y. 2021. Prevention of COVID-19 among older adults receiving

- pneumococcal conjugate vaccine suggests interactions between *Streptococcus pneumoniae* and SARS-CoV-2 in the respiratory tract. *J Infect Dis*, jia128.
- LEWNARD, J. A., GIVON-LAVI, N. & DAGAN, R. 2020. Dose-specific Effectiveness of 7- and 13-Valent Pneumococcal conjugate vaccines against vaccine-serotype *Streptococcus pneumoniae* colonization in children. *Clin Infect Dis*, 71, e289-300.
- LEWNARD, J. A. & HANAGE, W. P. 2019. Making sense of differences in pneumococcal serotype replacement. *Lancet Infect Dis*, 19, e213-220.
- LI, M., HUANG, R., ZHOU, X., ZHANG, K., ZHENG, X. & GREGORY, R. L. 2014. Effect of nicotine on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *FEMS Microbiol Lett*, 350, 125-32.
- LI, Q., LI, Y. X., STAHL, G. L., THURMAN, J. M., HE, Y. & TONG, H. H. 2011. Essential role of factor B of the alternative complement pathway in complement activation and opsonophagocytosis during acute pneumococcal otitis media in mice. *Infect Immun*, 79, 2578-85.
- LIANG, X., YU, C., SUN, J., LIU, H., LANDWEHR, C., HOLMES, D. & JI, Y. 2006. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 74, 4655-65.
- LIESESE IYAMBA, J. M., SEIL, M., DEVLEESCHOUWER, M., TAKAISIKIKUNI, N. B. & DEHAYE, J. P. 2011. Study of the formation of a biofilm by clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 27, 811-21.
- LIN, F. L., VINOGRADOV, E., DENG, C., ZELLER, S., GREEN, B. A., JANSEN, K. U. & PAVLIAK, V. 2013. Identification of the common antigenic determinant shared by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 33A, 35A, and 20 capsular polysaccharides. *Carbohydr Res*, 380, 101-7.
- LINA, G., BOHACH, G. A., NAIR, S. P., HIRAMATSU, K., JOUVIN-MARCHE, E. & MARIUZZA, R. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis*, 189, 2334-6.
- LIÑARES, J., ARDANUY, C., PALLARES, R. & FENOLL, A. 2010. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect*, 16, 402-10.
- LIPSITCH, M. & SIBER, G. R. 2016. How can vaccines contribute to solving the antimicrobial resistance problem? *mBio*, 7, e00428-16.
- LIU, C. M., PRICE, L. B., HUNGATE, B. A., ABRAHAM, A. G., LARSEN, L. A., CHRISTENSEN, K., STEGGER, M., SKOV, R. & ANDERSEN, P. S. 2015. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Sci Adv*, 1, e1400216.
- LLULL, D., GARCÍA, E. & LÓPEZ, R. 2001a. Tts, a processive  $\beta$ -glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in pneumococcus and other Gram-positive species. *J Biol Chem*, 276, 21053-61.
- LLULL, D., LÓPEZ, R. & GARCÍA, E. 2001b. Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr Mol Med*, 1, 475-91.
- LLULL, D., LÓPEZ, R. & GARCÍA, E. 2006. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol*, 44, 1250-6.
- LOEFFLER, J. M., DJURKOVIC, S. & FISCHETTI, V. A. 2003. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*, 71, 6199-204.
- LOESSNER, M. J., KRAMER, K., EBEL, F. & SCHERER, S. 2002. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol*, 44, 335-49.
- LÖFLING, J., VIMBERG, V., BATTIG, P. & HENRIQUES-NORMARK, B. 2011. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. *Cell Microbiol*, 13, 186-97.
- LOH, L. N., GAO, G. & TUOMANEN, E. I. 2017. Dissecting bacterial cell wall entry and signaling in eukaryotic cells: an actin-dependent pathway parallels platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis. *mBio*, 8, e02030-16.
- LOUBET, P., KERNÉIS, S., GROH, M., LOULERGUE, P., BLANCHE, P., VERGER, P. & LAUNAY, O. 2015. Attitude, knowledge and factors associated with influenza and pneumococcal vaccine uptake in a large cohort of patients with secondary immune deficiency. *Vaccine*, 33, 3703-8.
- LOUGHRAN, A. J., ORIHUELA, C. J. & TUOMANEN, E. I. 2019. *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. *Microbiol Spectr*, 7.

- LUND, E. 1970. On the nomenclature of the pneumococcal types. *Int J Syst Bacteriol*, 20, 321-3.
- LUND, E. & HENRICHSEN, J. 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol*, 12, 241-62.
- LUNDBO, L. F., HARBOE, Z. B., CLAUSEN, L. N., HOLLEGAARD, M. V., SØRENSEN, H. T., HOUGAARD, D. M., KONRADSEN, H. B., NØRGAARD, M. & BENFIELD, T. 2014. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms are not associated with susceptibility to invasive pneumococcal disease in children. *Clin Infect Dis*, 59, e66-71.
- LUONG, T. T., LEI, M. G. & LEE, C. Y. 2009. *Staphylococcus aureus* Rbf activates biofilm formation in vitro and promotes virulence in a murine foreign body infection model. *Infect Immun*, 77, 335-40.
- MA, J., CHENG, X., XU, Z., ZHANG, Y., VALLE, J., FAN, S., ZUO, X., LASA, I. & FANG, X. 2021. Structural mechanism for modulation of functional amyloid and biofilm formation by staphylococcal Bap protein switch. *EMBO J*, 40, e107500.
- MA, Y., XU, Y., YESTREPSKY, B. D., SORENSON, R. J., CHEN, M., LARSEN, S. D. & SUN, H. 2012. Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation. *PLoS One*, 7, e47255.
- MACINTYRE, C. R., CHUGHTAI, A. A., BARNES, M., RIDDA, I., SEALE, H., TOMS, R. & HEYWOOD, A. 2018. The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1)pdm09. *BMC Infect Dis*, 18, 637.
- MACK, D., FISCHER, W., KROKOTSCH, A., LEOPOLD, K., HARTMANN, R., EGGE, H. & LAUFS, R. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear  $\beta$ -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*, 178, 175-83.
- MACKENZIE, G. A., HILL, P. C., JEFFRIES, D. J., HOSSAIN, I., UCHENDU, U., AMEH, D., NDIAYE, M., ADEYEMI, O., PATHIRANA, J., OLATUNJI, Y., ABATAN, B., MUHAMMAD, B. S., FOMBAH, A. E., SAHA, D., PLUMB, I., AKANO, A., EBRUKE, B., IDEH, R. C., KUTI, B., GITHUA, P., OLUTUNDE, E., OFORDILE, O., GREEN, E., USUF, E., BADJI, H., IKUMAPAYI, U. N. A., MANJANG, A., SALAUDEEN, R., NSEKONG, E. D., JARJU, S., ANTONIO, M., SAMBOU, S., CEESAY, L., LOWE-JALLOW, Y., JASSEH, M., MULHOLLAND, K., KNOLL, M., LEVINE, O. S., HOWIE, S. R., ADEGBOLA, R. A., GREENWOOD, B. M. & CORRAH, T. 2016. Effect of the introduction of pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in The Gambia: a population-based surveillance study. *Lancet Infect Dis*, 16, 703-711.
- MACLEOD, C. M., HODGES, R. G., HEIDELBERGER, M. & BERNHARD, W. G. 1945. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 82, 445-65.
- MADHI, S. A. & KLUGMAN, K. P. 2004. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med*, 10, 811-3.
- MAESTRO, B. & SANZ, J. M. 2016. Choline binding proteins from *Streptococcus pneumoniae*: a dual role as enzybiotics and targets for the design of new antimicrobials. *Antibiotics*, 5, 21.
- MAH, T. F. & O'TOOLE, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9, 34-9.
- MAHAJAN, A., SINGH, B., KASHYAP, D., KUMAR, A. & MAHAJAN, P. 2013. Interspecies communication and periodontal disease. *ScientificWorldJournal*, 2013, 765434.
- MAIRA-LITRÁN, T., KROPEC, A., ABEYGUNAWARDANA, C., JOYCE, J., MARK, G., 3RD, GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 2002. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun*, 70, 4433-40.
- MAKINO, S. I., YAMAMOTO, K., ASAKURA, H. & SHIRAHATA, T. 2000. Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. *FEMS Microbiol Lett*, 186, 313-7.
- MALLEY, R. & ANDERSON, P. W. 2012. Serotype-independent pneumococcal experimental vaccines that induce cellular as well as humoral immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 3623-7.
- MANDELL, L. A., WUNDERINK, R. G., ANZUETO, A., BARTLETT, J. G., CAMPBELL, G. D., DEAN, N. C., DOWELL, S. F., FILE, T. M., JR., MUSER, D. M., NIEDERMAN, M. S., TORRES, A. & WHITNEY, C. G. 2007. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*, 44 Suppl 2, S27-72.

- MANN, E. E., RICE, K. C., BOLES, B. R., ENDRES, J. L., RANJIT, D., CHANDRAMOHAN, L., TSANG, L. H., SMELTZER, M. S., HORSWILL, A. R. & BAYLES, K. W. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 4, e5822.
- MANOHARAN, A., DAS, T., WHITELEY, G. S., GLASBEY, T., KRIEL, F. H. & MANOS, J. 2020. The effect of *N*-acetylcysteine in a combined antibiofilm treatment against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 75, 1787-1798.
- MARGOLIS, E. 2009. Hydrogen peroxide-mediated interference competition by *Streptococcus pneumoniae* has no significant effect on *Staphylococcus aureus* nasal colonization of neonatal rats. *J Bacteriol*, 191, 571-5.
- MARIMON, J. M., MONASTERIO, A., ERCIBENGOA, M., PASCUAL, J., PRIETO, I., SIMÓN, L. & PEREZ-TRALLERO, E. 2010. Antibody microarray typing, a novel technique for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *J Microbiol Methods*, 80, 274-80.
- MARRIOTT, H. M. & DOCKRELL, D. H. 2007. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res*, 33, 493-505.
- MARTÍ-LLITERAS, P., REGUEIRO, V., MOREY, P., HOOD, D. W., SAUS, C., SAULEDA, J., AGUSTÍ, A. G., BENGOCHEA, J. A. & GARMENDIA, J. 2009. Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun*, 77, 4232-42.
- MARTÍN-GALIANO, A. J., BALSALOBRE, L., FENOLL, A. & DE LA CAMPA, A. G. 2003. Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3187-94.
- MARUYAMA, Y., NAKAMICHI, Y., ITOH, T., MIKAMI, B., HASHIMOTO, W. & MURATA, K. 2009. Substrate specificity of streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolases for sulfated glycosaminoglycan. *J Biol Chem*, 284, 18059-69.
- MCALLISTER, L. J., OGUNNIYI, A. D., STROEHER, U. H., LEACH, A. J. & PATON, J. C. 2011. Contribution of serotype and genetic background to virulence of serotype 3 and serogroup 11 pneumococcal isolates. *Infect Immun*, 79, 4839-49.
- MCCARTHY, H. R., JK., BLACK, NS., GALLAGHER, L., O'NEILL, E., O'GARA, JP. 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 9.
- MCCARTY, M., TAYLOR, H.E. Y AVERY, O.T. 1946. Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 11, 177-83.
- MCCORMICK, J. K., YARWOOD, J. M. & SCHLIEVERT, P. M. 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol*, 55, 77-104.
- MCDANIEL, L. S. & SWIATLO, E. 2016. Should pneumococcal vaccines eliminate nasopharyngeal colonization? *mBio*, 7, e00545-16.
- MCEACHERN, E. K., HWANG, J. H., SLADEWSKI, K. M., NICATIA, S., DEWITZ, C., MATHEW, D. P., NIZET, V. & CROTTY ALEXANDER, L. E. 2015. Analysis of the effects of cigarette smoke on staphylococcal virulence phenotypes. *Infect Immun*, 83, 2443-52.
- MCGUINNESS, W. A., MALACHOWA, N. & DELEO, F. R. 2017. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*, 90, 269-281.
- MCLAUGHLIN, J. M., JIANG, Q., GESSNER, B. D., SWERDLOW, D. L., SINGS, H. L., ISTURIZ, R. E. & JODAR, L. 2019. Pneumococcal conjugate vaccine against serotype 3 pneumococcal pneumonia in adults: A systematic review and pooled analysis. *Vaccine*, 37, 6310-6.
- MCLAUGHLIN, J. M., JIANG, Q., ISTURIZ, R. E., SINGS, H. L., SWERDLOW, D. L., GESSNER, B. D., CARRICO, R. M., PEYRANI, P., WIEMKEN, T. L., MATTINGLY, W. A., RAMIREZ, J. A. & JODAR, L. 2018. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine against hospitalization for community-acquired pneumonia in older US adults: a test-negative design. *Clin Infect Dis*, 67, 1498-506.
- MCLOUGHLIN, R. M., SOLINGA, R. M., RICH, J., ZALESKI, K. J., COCCHIARO, J. L., RISLEY, A., TZIANABOS, A. O. & LEE, J. C. 2006. CD4<sup>+</sup> T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10408-413.
- MCMASTER, S. K., PAUL-CLARK, M. J., WALTERS, M., FLEET, M., ANANDARAJAH, J., SRISKANDAN, S. & MITCHELL, J. A. 2008. Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress. *Br J Pharmacol*, 153, 536-43.

- MEDICUS, R. G., GÖTZE, O. & MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1976. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med*, 144, 1076-93.
- MEJÍA, C., ZURITA, J. & GUZMÁN-BLANCO, M. 2010. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Rev Chilena Infectol*, 27, S51-8.
- MELISH, M. E. & GLASGOW, L. A. 1971. Staphylococcal scalded skin syndrome: the expanded clinical syndrome. *J Pediatr*, 78, 958-67.
- MELLES, D. C., BOGAERT, D., GORKINK, R. F. J., PEETERS, J. K., MOORHOUSE, M. J., OTT, A., VAN LEEUWEN, W. B., SIMONS, G., VERBRUGH, H. A., HERMANS, P. W. M. & VAN BELKUM, A. 2007. Nasopharyngeal co-colonization with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in children is bacterial genotype independent. *Microbiology*, 153, 686-92.
- MILUCKY, J., CARVALHO, M. G., ROUPHAEL, N., BENNETT, N. M., TALBOT, H. K., HARRISON, L. H., FARLEY, M. M., WALSTON, J., PIMENTA, F. & LESSA, F. C. 2019. *Streptococcus pneumoniae* colonization after introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for US adults 65 years of age and older, 2015-2016. *Vaccine*, 37, 1094-100.
- MITSU, E., REINÉ, J., URBAN, B. C., SOLÓRZANO, C., NIKOLAOU, E., HYDER-WRIGHT, A. D., POJAR, S., HOWARD, A., HITCHINS, L., GLYNN, S., FARRAR, M., LIATSIKOS, K., COLLINS, A. M., WALKER, N. F., HILL, H., GERMAN, E. L., CHELIOTIS, K. S., BYRNE, R. L., WILLIAMS, C. T., CUBAS-ATIENZAR, A. I., FLECHER, T., ADAMS, E. R., DRAPER, S. J., PULIDO, D., BEAVON, R., THEILACKER, C., BEGIER, E., JODAR, L., GESSNER, B. D. & FERREIRA, D. M. 2021. *Streptococcus pneumoniae* colonisation associates with impaired adaptive immune responses against SARS-CoV-2. 2021.07.22.21260837.
- MOBERLEY, S., HOLDEN, J., TATHAM, D. P. & ANDREWS, R. M. 2013. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane Database Syst Reviews*, 2013, CD000422.
- MOFFITT, K. L., YADAV, P., WEINBERGER, D. M., ANDERSON, P. W. & MALLEY, R. 2012. Broad antibody and T cell reactivity induced by a pneumococcal whole-cell vaccine. *Vaccine*, 30, 4316-22.
- MOFFITT, M. C. & FRANK, M. M. 1994. Complement resistance in microbes. *Springer Semin Immunopathol*, 15, 327-44.
- MOHSENI, M., RAFIEI, F. & GHAEMI, E. A. 2018. High frequency of exfoliative toxin genes among *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in the north of Iran: Alarm for the health of individuals under risk. *Iran J Microbiol*, 10, 158-65.
- MOKADDAS, E., SYED, S. & ALBERT, M. J. 2021. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) does not appear to provide much protection on combined invasive disease due to the six PCV13 non-PCV7 serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F, and 19A in Kuwait during 2010-2019. *Hum Vaccin Immunother*, 1-6.
- MOLINA, R., GONZÁLEZ, A., STELTER, M., PÉREZ-DORADO, I., KAHN, R., MORALES, M., MOSCOSO, M., CAMPUZANO, S., CAMPILLO, N. E., MOBASHERY, S., GARCÍA, J. L., GARCÍA, P. & HERMOSO, J. A. 2009. Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep*, 10, 246-51.
- MONMATURAPOJ, T., MONTAKANTIKUL, P., MOOTSIKAPUN, P. & TRAGULPIANKIT, P. 2012. A prospective, randomized, double dummy, placebo-controlled trial of oral cefditoren pivoxil 400 mg once daily as switch therapy after intravenous ceftriaxone in the treatment of acute pyelonephritis. *Int J Infect Dis*, 16, e843-9.
- MOORE, M. R., LINK-GELLES, R., SCHAFFNER, W., LYNFIELD, R., LEXAU, C., BENNETT, N. M., PETIT, S., ZANSKY, S. M., HARRISON, L. H., REINGOLD, A., MILLER, L., SCHERZINGER, K., THOMAS, A., FARLEY, M. M., ZELL, E. R., TAYLOR, T. H., JR., PONDO, T., RODGERS, L., MCGEE, L., BEALL, B., JORGENSEN, J. H. & WHITNEY, C. G. 2015. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis*, 15, 301-9.
- MOORMEIER, D. E. & BAYLES, K. W. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*, 104, 365-76.
- MOORMEIER, D. E., BOSE, J. L., HORSWILL, A. R. & BAYLES, K. W. 2014. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*, 5, e01341-14.

- MOOTZ, J. M., BENSON, M. A., HEIM, C. E., CROSBY, H. A., KAVANAUGH, J. S., DUNMAN, P. M., KIELIAN, T., TORRES, V. J. & HORSWILL, A. R. 2015. Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Mol Microbiol*, 96, 388-404.
- MORAIS, V., DEE, V. & SUÁREZ, N. 2018. Purification of capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: traditional and new methods. *Front Bioeng Biotechnol*, 6, 145.
- MORALES, M., GARCÍA, P., DE LA CAMPA, A. G., LIÑARES, J., ARDANUY, C. & GARCÍA, E. 2010. Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene, encoding the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol*, 192, 2624-32.
- MØRCH, E. 1942. Diagnostic antipneumococcal sera produced by immunization with one or more types of the pneumococcus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 19, 497-522.
- MOSCHIONI, M., DONATI, C., MUZZI, A., MASIGNANI, V., CENSINI, S., HANAGE, W. P., BISHOP, C. J., REIS, J. N., NORMARK, S., HENRIQUES-NORMARK, B., COVACCI, A., RAPPUOLI, R. & BAROCCHI, M. A. 2008. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 *rlrA* pilus variants that are clonally related. *J Infect Dis*, 197, 888-96.
- MOSCOSO, M., DOMENECH, M. & GARCÍA, E. 2010. Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol*, 77, 1052-64.
- MOSCOSO, M. & GARCÍA, E. 2009. Transcriptional regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatic analysis. *DNA Res*, 16, 177-86.
- MOSCOSO, M., GARCÍA, E. & LÓPEZ, R. 2006. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol*, 188, 7785-95.
- MOSCOSO, M., OBREGÓN, V., LÓPEZ, R., GARCÍA, J. L. & GARCÍA, E. 2005. Allelic variation of polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl Environ Microbiol*, 71, 8706-13.
- MOSSER, J. L. & TOMASZ, A. 1970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem*, 245, 287-98.
- MRAK, L. N., ZIELINSKA, A. K., BEENKEN, K. E., MRAK, I. N., ATWOOD, D. N., GRIFFIN, L. M., LEE, C. Y. & SMELTZER, M. S. 2012. *saeRS* and *sarA* act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 7, e38453.
- MUKERJI, R., MIRZA, S., ROCHE, A. M., WIDENER, R. W., CRONEY, C. M., RHEE, D. K., WEISER, J. N., SZALAI, A. J. & BRILES, D. E. 2012. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. *J Immunol*, 189, 5327-35.
- MUNOZ, F. M., HAWKINS, E. P., BULLARD, D. C., BEAUDET, A. L. & KAPLAN, S. L. 1997. Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J Clin Invest*, 100, 2099-106.
- MUÑOZ-ELÍAS, E. J., MARCANO, J. & CAMILLI, A. 2008. Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect Immun*, 76, 5049-61.
- MURRAY, R. J., ROBINSON, J. O., WHITE, J. N., HUGHES, F., COOMBS, G. W., PEARSON, J. C., TAN, H. L., CHIDLOW, G., WILLIAMS, S., CHRISTIANSEN, K. J. & SMITH, D. W. 2010. Community-acquired pneumonia due to pandemic A(H1N1)2009 influenza virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* co-infection. *PLoS One*, 5, e8705.
- MUTEPE, N. D., COCKERAN, R., STEEL, H. C., THERON, A. J., MITCHELL, T. J., FELDMAN, C. & ANDERSON, R. 2013. Effects of cigarette smoke condensate on pneumococcal biofilm formation and pneumolysin. *Eur Respir J*, 41, 392-5.
- NAGAI, K., DAVIES, T. A., JACOBS, M. R. & APPELBAUM, P. C. 2002. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1273-80.
- NAHM, M. H., BRILES, D. E. & YU, X. 2000. Development of a multi-specificity opsonophagocytic killing assay. *Vaccine*, 18, 2768-71.

- NANRA, J. S., BUITRAGO, S. M., CRAWFORD, S., NG, J., FINK, P. S., HAWKINS, J., SCULLY, I. L., MCNEIL, L. K., ASTE-AMÉZAGA, J. M., COOPER, D., JANSEN, K. U. & ANDERSON, A. S. 2013. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother*, 9, 480-7.
- NAUSEEF, W. M. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*, 219, 88-102.
- NELSON, A. L., ROCHE, A. M., GOULD, J. M., CHIM, K., RATNER, A. J. & WEISER, J. N. 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun*, 75, 83-90.
- NELSON, D., LOOMIS, L. & FISCHETTI, V. A. 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4107-12.
- NEMETH, J. & LEE, J. C. 1995. Antibodies to capsular polysaccharides are not protective against experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Infect Immun*, 63, 375-80.
- NEUFELD, F. 1902. Ueber die agglutination der pneumokokken und über die theorien der agglutination. I. Die agglutination der pneumokokken. *Z Hyg Infektionskrankh*, 40, 54-72.
- NICHOLLS, T. R., LEACH, A. J. & MORRIS, P. S. 2016. The short-term impact of each primary dose of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *Vaccine*, 34, 703-13.
- NIETO-MORO, M., ECCLESIA, F. G., TOMÉ-MASA, I., DE LAMA CARO-PATÓN, G., LEOZ-GORDILLO, I., CABRERO-HERNÁNDEZ, M. & GARCÍA-SALIDO, A. 2020. SARS-CoV-2 and *Streptococcus pneumoniae* coinfection as a cause of severe pneumonia in an infant. *Pediatr Pulmonol*, 55, 2198-200.
- NILSSON, I. M., LEE, J. C., BREMELL, T., RYDÉN, C. & TARKOWSKI, A. 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect Immun*, 65, 4216-21.
- NISHIFUJI, K., SUGAI, M. & AMAGAI, M. 2008. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci*, 49, 21-31.
- NISTICO, L., KREFT, R., GIESEKE, A., COTICCHIA, J. M., BURROWS, A., KHAMPANG, P., LIU, Y., KERSCHNER, J. E., POST, J. C., LONERGAN, S., SAMPATH, R., HU, F. Z., EHRLICH, G. D., STOODLEY, P. & HALL-STOODLEY, L. 2011. Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J Clin Microbiol*, 49, 1411-20.
- NITHYA, S., NIMAL, T. R., BARANWAL, G., SURESH, M. K., C, P. A., ANIL KUMAR, V., GOPI MOHAN, C., JAYAKUMAR, R. & BISWAS, R. 2018. Preparation, characterization and efficacy of lysostaphin-chitosan gel against *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol*, 110, 157-66.
- NOVICK, R. P., PROJAN, S. J., KORNBLUM, J., ROSS, H. F., JI, G., KREISWIRTH, B., VANDENESCH, F. & MOGHAZEH, S. 1995. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, 248, 446-58.
- NOVICK, R. P., ROSS, H. F., PROJAN, S. J., KORNBLUM, J., KREISWIRTH, B. & MOGHAZEH, S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*, 12, 3967-75.
- NUORTI, J. P., BUTLER, J. C., FARLEY, M. M., HARRISON, L. H., MCGEER, A., KOLCZAK, M. S. & BREIMAN, R. F. 2000. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. Active Bacterial Core Surveillance Team. *N Engl J Med*, 342, 681-9.
- O'BRIEN, K. L., MILLAR, E. V., ZELL, E. R., BRONSDON, M., WEATHERHOLTZ, R., REID, R., BECENTI, J., KVAMME, S., WHITNEY, C. G. & SANTOSHAM, M. 2007. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. *J Infect Dis*, 196, 1211-20.
- O'NEILL, E., POZZI, C., HOUSTON, P., SMYTH, D., HUMPHREYS, H., ROBINSON, D. A. & O'GARA, J. P. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol*, 45, 1379-88.
- O'RIORDAN, K. & LEE, J. C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*, 17, 218-34.
- OCHS, M. M., BARTLETT, W., BRILES, D. E., HICKS, B., JURKUVENAS, A., LAU, P., REN, B. & MILLAR, A. 2008. Vaccine-induced human antibodies to PspA augment complement C3 deposition on *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*, 44, 204-14.

- OGAWA, Y., OOKA, T., SHI, F., OGURA, Y., NAKAYAMA, K., HAYASHI, T. & SHIMOJI, Y. 2011. The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J Bacteriol*, 193, 2959-71.
- OGGIONI, M. R., TRAPPETTI, C., KADIOGLU, A., CASSONE, M., IANNELLI, F., RICCI, S., ANDREW, P. W. & POZZI, G. 2006. Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol*, 61, 1196-210.
- OGSTON, A. 1882. Micrococcus poisoning. *J Anat Physiol*, 16, 526.
- OGSTON, A. 1984. On abscesses. *Rev Infect Dis*, 6, 122-8.
- OLIVEIRA, D., BORGES, A. & SIMÕES, M. 2018. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10, 252.
- OLSEN, K., FALCH, B. M., DANIELSEN, K., JOHANNESSEN, M., ERICSON SOLLID, J. U., THUNE, I., GRIMNES, G., JORDE, R., SIMONSEN, G. S. & FURBERG, A. S. 2012. *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 465-73.
- OLSON, M. E., NYGAARD, T. K., ACKERMANN, L., WATKINS, R. L., ZUREK, O. W., PALLISTER, K. B., GRIFFITH, S., KIEDROWSKI, M. R., FLACK, C. E., KAVANAUGH, J. S., KREISWIRTH, B. N., HORSWILL, A. R. & VOYICH, J. M. 2013. *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. *Infect Immun*, 81, 1316-24.
- OMS. 2020. *The top 10 causes of death* [Online]. who.int. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Accessed 15-09-2021].
- OORDT-SPEETS, A. M., BOLIJN, R., VAN HOORN, R. C., BHAVSAR, A. & KYAW, M. H. 2018. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 13, e0198772.
- ORENSTEIN, A. 2011. The discovery and naming of *Staphylococcus aureus*. Available: <https://antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf> [Accessed 15-09-2021].
- ORIHUELA, C. J., MAHDAVI, J., THORNTON, J., MANN, B., WOOLDRIDGE, K. G., ABOUSEADA, N., OLDFIELD, N. J., SELF, T., ALA'ALDEEN, D. A. & TUOMANEN, E. I. 2009. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest*, 119, 1638-46.
- OTTO, M. 2010. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*, 64, 143-62.
- OTTO, M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*, 17, 32-7.
- OULDALI, N., VARON, E., LEVY, C., ANGOULVANT, F., GEORGES, S., PLOY, M. C., KEMPF, M., CREMNITER, J., COHEN, R., BRUHL, D. L. & DANIS, K. 2021. Invasive pneumococcal disease incidence in children and adults in France during the pneumococcal conjugate vaccine era: an interrupted time-series analysis of data from a 17-year national prospective surveillance study. *Lancet Infect Dis*, 21, 137-147.
- OYEWOLE, O. R., LANG, P., ALBRICH, W. C., WISSEL, K., LEIB, S. L., CASANOVA, C. & HILTY, M. 2021. The impact of pneumococcal conjugate vaccine (PCV) coverage heterogeneities on the changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Switzerland, 2005–2019. *Microorganisms*, 9, 1078.
- PANCHOLI, V., FONTAN, P. & JIN, H. 2003. Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microb Pathog*, 35, 293-303.
- PARK, B., NIZET, V. & LIU, G. Y. 2008. Role of *Staphylococcus aureus* catalase in niche competition against *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 190, 2275-8.
- PARSEK, M. R. & GREENBERG, E. P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*, 13, 27-33.
- PASTAGIA, M., SCHUCH, R., FISCHETTI, V. A. & HUANG, D. B. 2013. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol*, 62, 1506-1516.
- PASTEUR, L. 1881. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med (Paris)*, 10, 94-103.
- PATEL, D., WINES, B. D., LANGLEY, R. J. & FRASER, J. D. 2010. Specificity of staphylococcal superantigen-like protein 10 toward the human IgG1 Fc domain. *J Immunol*, 184, 6283-92.
- PEACOCK, S. J. & PATERSON, G. K. 2015. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 84, 577-601.

- PEETERS, E., HOOYBERGHS, G., ROBIJNS, S., DE WEERDT, A., KUCHARÍKOVÁ, S., TOURNU, H., BRAEM, A., ČEH, K., MAJDIĆ, G., ŠPANIČ, T., POGOREVC, E., CLAES, B., DOVGAN, B., GIRANDON, L., IMPELLIZZERI, F., ERDTMANN, M., KRONA, A., VLEUGELS, J., FRÖHLICH, M., GARCIA-FORGAS, J., DE BRUCKER, K., CAMMUE, B. P. A., THEVISSSEN, K., VAN DIJCK, P., VANDERLEYDEN, J., VAN DER EYCKEN, E. & STEENACKERS, H. P. 2019. An antibiofilm coating of 5-aryl-2-aminoimidazole covalently attached to a titanium surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 107, 1908-19.
- PÉREZ-TRALLERO, E., GARCÍA-DE-LA-FUENTE, C., GARCÍA-REY, C., BAQUERO, F., AGUILAR, L., DAL-RÉ, R. & GARCÍA-DE-LOMAS, J. 2005. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1965-72.
- PEREZ, A. C., PANG, B., KING, L. B., TAN, L., MURRAH, K. A., REIMCHE, J. L., WREN, J. T., RICHARDSON, S. H., GHANDI, U. & SWORDS, W. E. 2014. Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence *in vivo*. *Pathog Dis*, 70, 280-8.
- PERIASAMY, S., JOO, H. S., DUONG, A. C., BACH, T. H., TAN, V. Y., CHATTERJEE, S. S., CHEUNG, G. Y. & OTTO, M. 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1281-6.
- PESTOVA, E. V., HÁVARSTEIN, L. S. & MORRISON, D. A. 1996. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol*, 21, 853-62.
- PETON, V. & LE LOIR, Y. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol*, 21, 602-15.
- PHAM, T., FAUTREL, B., GOTTENBERG, J. E., GOUPILLE, P., HACHULLA, E., MASSON, C., MOREL, J., MOUTHON, L., SARAUX, A., SCHAEVERBEKE, T., WENDLING, D., MARIETTE, X. & SIBILIA 2008. Rituximab (MabThera) therapy and safety management. Clinical tool guide. *Joint Bone Spine*, 75, S1-99.
- PICARD, C., PUEL, A., BUSTAMANTE, J., KU, C. L. & CASANOVA, J. L. 2003. Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3, 451-9.
- PICHON, B., LADHANI, S. N., SLACK, M. P., SEGONDS-PICHON, A., ANDREWS, N. J., WRIGHT, P. A., MILLER, E. & GEORGE, R. 2013. Changes in molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis following introduction of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales. *J Clin Microbiol*, 51, 820-7.
- PILISHVILI, T., GIERKE, R., FARLEY, M., SCHAFFNER, W., THOMAS, A., REINGOLD, A., HARRISON, L., LYNFIELD, R., ZANSKY, S. M., PETIT, S., MILLER, L., BAUMBACH, J., BEALL, B. & WHITNEY, C. G. 2017. Direct and indirect impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) on invasive pneumococcal disease (IPD) among children and adults in the U.S. *Open Forum Infect Dis*, 4, S66-7.
- PILISHVILI, T., LEXAU, C., FARLEY, M. M., HADLER, J., HARRISON, L. H., BENNETT, N. M., REINGOLD, A., THOMAS, A., SCHAFFNER, W., CRAIG, A. S., SMITH, P. J., BEALL, B. W., WHITNEY, C. G. & MOORE, M. R. 2010. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*, 201, 32-41.
- PIMENTA, F., MOIANE, B., GERTZ, R. E., CHOCHUA, S., SNIPPES VAGNONE, P. M., LYNFIELD, R., SIGAÚQUE, B., CARVALHO, M. D. G. & BEALL, B. 2021. New pneumococcal serotype 15D. *J Clin Microbiol*, 59, e00329-21.
- PODVIN, L., REYSSET, G., HUBERT, J. & SEBALD, M. 1988. Presence of choline in teichoic acid of *Clostridium acetobutylicum* N1-4 and choline inhibition of autolytic functions. *J Microbiology*, 134, 1603-9.
- PÖHLMANN-DIETZE, P., ULRICH, M., KISER, K. B., DÖRING, G., LEE, J. C., FOURNIER, J. M., BOTZENHART, K. & WOLZ, C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. *Infect Immun*, 68, 4865-71.
- POLLÁN, M., PÉREZ-GÓMEZ, B., PASTOR-BARRIUSO, R., OTEO, J., HERNÁN, M. A., PÉREZ-OLMEDA, M., SANMARTÍN, J. L., FERNÁNDEZ-GARCÍA, A., CRUZ, I., FERNÁNDEZ DE LARREA, N., MOLINA, M., RODRÍGUEZ-CABRERA, F., MARTÍN, M., MERINO-AMADOR, P., LEÓN PANIAGUA, J., MUÑOZ-MONTALVO, J. F., BLANCO, F. & YOTTI, R. 2020. Prevalence

- of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*, 396, 535-544.
- PORTOLÉS, M., KISER, K. B., BHASIN, N., CHAN, K. H. & LEE, J. C. 2001. *Staphylococcus aureus* Cap50 has UDP-ManNAc dehydrogenase activity and is essential for capsule expression. *Infect Immun*, 69, 917-23.
- POZZI, C., WATERS, E. M., RUDKIN, J. K., SCHAEFFER, C. R., LOHAN, A. J., TONG, P., LOFTUS, B. J., PIER, G. B., FEY, P. D., MASSEY, R. C. & O'GARA, J. P. 2012. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog*, 8, e1002626.
- PROCTOR, R. N. 2012. The history of the discovery of the cigarette-lung cancer link: evidentiary traditions, corporate denial, global toll. *Tob Control*, 21, 87-91.
- QUAVE, C. L. & HORSWILL, A. R. 2014. Flipping the switch: tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Front Microbiol*, 5, 706.
- QUIN, L. R., CARMICLE, S., DAVE, S., PANGBURN, M. K., EVENHUIS, J. P. & MCDANIEL, L. S. 2005. In vivo binding of complement regulator factor H by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 192, 1996-2003.
- QUIN, L. R., ONWUBIKO, C., MOORE, Q. C., MILLS, M. F., MCDANIEL, L. S. & CARMICLE, S. 2007. Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infect Immun*, 75, 4082-7.
- QUINTERO, B., ARAQUE, M., VAN DER GAASST-DE JONGH, C., ESCALONA, F., CORREA, M., MORILLO-PUENTE, S., VIELMA, S. & HERMANS, P. W. 2011. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* colonization in healthy Venezuelan children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 30, 7-19.
- RAMAKRISHNAN, V. R. & FRANK, D. N. 2015. Impact of cigarette smoking on the middle meatus microbiome in health and chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*, 5, 981-9.
- RAMASUBBU, N., THOMAS, L. M., RAGUNATH, C. & KAPLAN, J. B. 2005. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Mol Biol*, 349, 475-86.
- RAMMELKAMP, C. H. & MAXON, T. J. P. O. T. S. F. E. B. 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Pro SocExp Biol Med*, 51, 386-9.
- RAMOS-SEVILLANO, E., ERCOLI, G., FELGNER, P., RAMIRO DE ASSIS, R., NAKAJIMA, R., GOLDBLATT, D., HEYDERMAN, R. S., GORDON, S. B., FERREIRA, D. M. & BROWN, J. S. 2020. Preclinical development of virulence attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains able to enhance protective immunity against pneumococcal infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 203, 1037-41.
- RAMOS-SEVILLANO, E., MOSCOSO, M., GARCÍA, P., GARCÍA, E. & YUSTE, J. 2011. Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 6, e23626.
- RAMOS-SEVILLANO, E., RODRÍGUEZ-SOSA, C., CAFINI, F., GIMÉNEZ, M. J., NAVARRO, A., SEVILLANO, D., ALOU, L., GARCÍA, E., AGUILAR, L. & YUSTE, J. 2012. Cefditoren and ceftriaxone enhance complement-mediated immunity in the presence of specific antibodies against antibiotic-resistant pneumococcal strains. *PLoS One*, 7, e44135.
- RAMOS-SEVILLANO, E., URZAINQUI, A., CAMPUZANO, S., MOSCOSO, M., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., DOMENECH, M., RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S., SÁNCHEZ-MADRID, F., BROWN, J. S., GARCÍA, E. & YUSTE, J. 2015. Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun*, 83, 591-603.
- RAMOS-SEVILLANO, E., URZAINQUI, A., DE ANDRÉS, B., GONZÁLEZ-TAJUELO, R., DOMENECH, M., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., SÁNCHEZ-MADRID, F., BROWN, J. S., GARCÍA, E. & YUSTE, J. 2016. PSGL-1 on leukocytes is a critical component of the host immune response against invasive pneumococcal disease. *PLoS Pathog*, 12, e1005500.
- RAVIN, A.W. 1959. Reciprocal capsular transformations of pneumococci. *J Bacteriol*, 77, 296-309.
- RAYNER, C. F., JACKSON, A. D., RUTMAN, A., DEWAR, A., MITCHELL, T. J., ANDREW, P. W., COLE, P. J. & WILSON, R. 1995. Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun*, 63, 442-7.
- READING, N. C. & SPERANDIO, V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 254, 1-11.

- REDDINGER, R. M., LUKE-MARSHALL, N. R., SAUBERAN, S. L., HAKANSSON, A. P. & CAMPAGNARI, A. A. 2018. *Streptococcus pneumoniae* modulates *Staphylococcus aureus* biofilm dispersion and the transition from colonization to invasive disease. *mBio*, 9, e02089-17.
- REDONDO, E., RIVERO-CALLE, I., MASCARÓS, E., DÍAZ-MAROTO, J. L., LINARES, M., GIL, A., MOLINA, J., JIMENO, I., OCAÑA, D., YUSTE, J. E. & MARTINÓN-TORRES, F. 2019. [The new official vaccine calendar for adults does not include the prevention of pneumococcal pneumonia]. *Rev Esp Quimioter*, 32, 281-3.
- REGEV-YOCHAY, G., DAGAN, R., RAZ, M., CARMELI, Y., SHAINBERG, B., DERAZNE, E., RAHAV, G. & RUBINSTEIN, E. 2004. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in children. *JAMA*, 292, 716-20.
- REICHMANN, P., NUHN, M., DENAPAITE, D., BRÜCKNER, R., HENRICH, B., MAURER, P., RIEGER, M., KLAGES, S., REINHARD, R. & HAKENBECK, R. 2011. Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. *J Bacteriol*, 193, 2888-9.
- REINERT, R. R. 2009. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 3, 7-11.
- RELLAHAN, B. L., JONES, L. A., KRUISBEEK, A. M., FRY, A. M. & MATIS, L. A. 1990. In vivo induction of energy in peripheral V $\beta$ 8<sup>+</sup> T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med*, 172, 1091-100.
- REN, B., LI, J., GENSCHEMER, K., HOLLINGSHEAD, S. K. & BRILES, D. E. 2012. The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. *Clin Vaccine Immunol*, 19, 1574-82.
- REN, B., MCCRORY, M. A., PASS, C., BULLARD, D. C., BALLANTYNE, C. M., XU, Y., BRILES, D. E. & SZALAI, A. J. 2004a. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol*, 173, 7506-12.
- REN, B., SZALAI, A. J., HOLLINGSHEAD, S. K. & BRILES, D. E. 2004b. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun*, 72, 114-22.
- RENAVE 2021. Encuesta de prevalencia de las IRAS y uso de antimicrobianos en los hospitales de España 2018-2019. In: (CNE), U. D. V. D. L. I. R. C. L. A. S. C. N. D. E. (ed.). Madrid, España.
- RIBEIRO, M., MONTEIRO, F. J. & FERRAZ, M. P. 2012. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater*, 2, 176-94.
- RICHI, P., YUSTE, J., NAVÍO, T., GONZÁLEZ-HOMBRADO, L., SALIDO, M., THUISSARD-VASALLO, I., JIMÉNEZ-DÍAZ, A., LLORENTE, J., CEBRIÁN, L., LOJO, L., STEINER, M., COBO, T., MARTÍN, M. D., GARCÍA-CASTRO, M., CASTRO, P. & MUÑOZ-FERNÁNDEZ, S. 2021. Impact of biological therapies on the immune response after pneumococcal vaccination in patients with autoimmune inflammatory diseases. *Vaccines*, 9, 203.
- RICHTER, L., SCHMID, D., KANITZ, E. E., ZWAZL, I., POLLABAUER, E., JASINSKA, J., BURGMANN, H., KUNDI, M. & WIEDERMANN, U. 2019. Invasive pneumococcal diseases in children and adults before and after introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine into the Austrian national immunization program. *PLoS One*, 14, e0210081.
- RILEY, I., ANDREWS, M., HOWARD, R., TARR, P., PFEIFFER, M., CHALLANDS, P., JENNISON, G. & DOUGLAS, R. 1977. Immunisation with a polyvalent pneumococcal vaccine: reduction of adult respiratory mortality in a New Guinea Highlands community. *Lancet*, 309, 1338-41.
- RISLEY, A. L., LOUGHMAN, A., CYWES-BENTLEY, C., FOSTER, T. J. & LEE, J. C. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *J Infect Dis*, 196, 919-27.
- RODRIGUES, M. E., GOMES, F. & RODRIGUES, C. F. 2019. *Candida spp./Bacteria* mixed biofilms. *J Fungi*, 6, 5.
- RODVOLD, K. A. & MCCONEGHY, K. W. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis*, 58 Suppl 1, S20-7.
- ROGASCH, K., RÜHMLING, V., PANÉ-FARRÉ, J., HÖPER, D., WEINBERG, C., FUCHS, S., SCHMUDDE, M., BRÖKER, B. M., WOLZ, C., HECKER, M. & ENGELMANN, S. 2006. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol*, 188, 7742-58.
- ROHDE, H., BURDELSKI, C., BARTSCHT, K., HUSSAIN, M., BUCK, F., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., HEILMANN, C., HERRMANN, M. & MACK, D. 2005. Induction of

- Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*, 55, 1883-95.
- ROIG-MOLINA, E., DOMENECH, M., RETAMOSA, M. G., NACHER-VÁZQUEZ, M., RIVAS, L., MAESTRO, B., GARCÍA, P., GARCÍA, E. & SANZ, J. M. 2019. Widening the antimicrobial spectrum of esters of bicyclic amines: In vitro effect on gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and gram-negative non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863, 96-104.
- ROM, O., AVEZOV, K., AIZENBUD, D. & REZNICK, A. Z. 2013. Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respir Physiol Neurobiol*, 187, 5-10.
- ROMERO-STEINER, S., LIBUTTI, D., PAIS, L. B., DYKES, J., ANDERSON, P., WHITIN, J. C., KEYSERLING, H. L. & CARLONE, G. M. 1997. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4, 415-22.
- ROOIJAKKERS, S. H., RUYKEN, M., ROOS, A., DAHA, M. R., PRESANIS, J. S., SIM, R. B., VAN WAMEL, W. J., VAN KESSEL, K. P. & VAN STRIJP, J. A. 2005a. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol*, 6, 920-7.
- ROOIJAKKERS, S. H., VAN WAMEL, W. J., RUYKEN, M., VAN KESSEL, K. P. & VAN STRIJP, J. A. 2005b. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect*, 7, 476-84.
- ROSENBAACH, A. J. F. 1884. *Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen*, JF Bergmann.
- ROSENOW, C., RYAN, P., WEISER, J. N., JOHNSON, S., FONTAN, P., ORTQVIST, A. & MASURE, H. R. 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 25, 819-29.
- RUSHWORTH, G. F. & MEGSON, I. L. 2014. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther*, 141, 150-9.
- RUSSELL, K. L., BAKER, C. I., HANSEN, C., POLAND, G. A., RYAN, M. A., MERRILL, M. M. & GRAY, G. C. 2015. Lack of effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine in reducing all-cause pneumonias among healthy young military recruits: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Vaccine*, 33, 1182-7.
- RUSSELL, R. E., THORLEY, A., CULPITT, S. V., DODD, S., DONNELLY, L. E., DEMATTOS, C., FITZGERALD, M. & BARNES, P. J. 2002. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L867-73.
- SAHU, A. & LAMBRIS, J. D. 2001. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev*, 180, 35-48.
- SAKAI, F., TALEKAR, S. J., LANATA, C. F., GRIJALVA, C. G., KLUGMAN, K. P. & VIDAL, J. E. 2013. Expression of *Streptococcus pneumoniae* virulence-related genes in the nasopharynx of healthy children. *PLoS One*, 8, e67147.
- SAKO, D., CHANG, X. J., BARONE, K. M., VACHINO, G., WHITE, H. M., SHAW, G., VELDMAN, G. M., BEAN, K. M., AHERN, T. J., FURIE, B. & ET AL. 1993. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*, 75, 1179-86.
- SAKURAI, S., SUZUKI, H. & MACHIDA, K. 1995. Rapid identification by polymerase chain reaction of staphylococcal exfoliative toxin serotype A and B genes. *Microbiol Immunol*, 39, 379-86.
- SALIMENA, A. P., LANGE, C. C., CAMUSSONE, C., SIGNORINI, M., CALVINHO, L. F., BRITO, M. A., BORGES, C. A., GUIMARÃES, A. S., RIBEIRO, J. B., MENDONÇA, L. C. & PICCOLI, R. H. 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet Res Commun*, 40, 97-106.
- SÁNCHEZ-BEATO, A. R. & GARCÍA, J. L. 1996. Molecular characterization of a family of choline-binding proteins of *Clostridium beijerinckii* NCIB 8052. Evolution and gene redundancy in prokaryotic cell. *Gene*, 180, 13-21.
- SÁNCHEZ-BEATO, A. R., LÓPEZ, R. & GARCÍA, J. L. 1998. Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett*, 164, 207-14.
- SANCHEZ, C. J., SHIVSHANKAR, P., STOL, K., TRAKHTENBROIT, S., SULLAM, P. M., SAUER, K., HERMANS, P. W. & ORIHUELA, C. J. 2010. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an

- intra-species bacterial adhesion that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog*, 6, e1001044.
- SARAVIA-OTTEN, P., MÜLLER, H. P. & ARVIDSON, S. 1997. Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and an *agr*-independent mechanism. *J Bacteriol*, 179, 5259-63.
- SAVULESCU, C., KRIZOVA, P., LEPOUTRE, A., MERECKIENE, J., VESTRHEIM, D. F., CIRUELA, P., ORDOBAS, M., GUEVARA, M., MCDONALD, E., MORFELDT, E., KOZAKOVA, J., VARON, E., COTTER, S., WINJE, B. A., MUNOZ-ALMAGRO, C., GARCIA, L., CASTILLA, J., SMITH, A., HENRIQUES-NORMARK, B., CELENTANO, L. P., HANQUET, G. & SP, I. G. 2017b. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SplDnet countries: an observational multicentre study. *Lancet Respir Med*, 5, 648-56.
- SCHAUDINN, C., GORUR, A., KELLER, D., SEDGHIZADEH, P. P. & COSTERTON, J. W. 2009. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc*, 140, 978-86.
- SCHERR, T. D., HEIM, C. E., MORRISON, J. M. & KIELIAN, T. 2014. Hiding in plain sight: interplay between staphylococcal biofilms and host immunity. *Front Immunol*, 5, 37.
- SCHILCHER, K. & HORSWILL, A. R. 2020. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 84, e00026-19.
- SCHNEEWIND, O., MODEL, P. & FISCHETTI, V. A. 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell*, 70, 267-81.
- SCHREIBER, A. D. & FRANK, M. M. 1972. Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes. I. In vivo effects of IgG and IgM complement-fixing sites. *J Clin Invest*, 51, 575-82.
- SEIDL, K., GOERKE, C., WOLZ, C., MACK, D., BERGER-BÄCHI, B. & BISCHOFF, M. 2008. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun*, 76, 2044-50.
- SEILIE, E. S. & BUBECK WARDENBURG, J. 2017. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Semin Cell Dev Biol*, 72, 101-16.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N. & WHITTAM, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*, 51, 873-84.
- SELINGER, D. S. & REED, W. P. 1979. Pneumococcal adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*, 23, 545-8.
- SEMPERE, J., LLAMOSÍ, M., DEL RÍO MENÉNDEZ, I., LÓPEZ RUIZ, B., DOMENECH, M. & GONZÁLEZ-CAMACHO, F. 2021a. Pneumococcal choline-binding proteins involved in virulence as vaccine candidates. *Vaccines*, 9, 181.
- SEMPERE, J., LLAMOSÍ, M., ROMAN, F., PÉREZ-GARCÍA, C., YUSTE, J. & DOMENECH, M. 2021b. Clearance of mixed biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and methicillin susceptible/resistant *Staphylococcus aureus* by antioxidants *N*-acetyl-L-cysteine and cysteamine. *Sci Rep*.
- SEMPSPH. & ECDC. 2017. Estudio EPINE-EPPS 2017. Available in: <https://www.epine.es/docs/public/reports/esp/2017%20EPINEEPPS%20Informe%20Global%20de%20Espa%C3%B1a%20Resumen.pdf> [Accessed 15-09-2021].
- SENKOVICH, O., COOK, W. J., MIRZA, S., HOLLINGSHEAD, S. K., PROTASEVICH, II, BRILES, D. E. & CHATTOPADHYAY, D. 2007. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. *J Mol Biol*, 370, 701-13.
- SEOANE, J., YANKELEVICH, T., DECHESNE, A., MERKEY, B., STERNBERG, C. & SMETS, B. F. 2011. An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol*, 75, 17-27.
- SETHI, S. & MURPHY, T. F. 2008. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 359, 2355-65.
- SEVILLANO, D., AGUILAR, L., ALOU, L., GIMÉNEZ, M. J., GONZÁLEZ, N., TORRICO, M., CAFINI, F., FENOLL, A., CORONEL, P. & PRIETO, J. 2008. High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant *S. pneumoniae*: a cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation. *PLoS One*, 3, e2717.
- SEVILLANO, D., GIMÉNEZ, M. J., ALOU, L., AGUILAR, L., CAFINI, F., TORRICO, M., GONZÁLEZ, N., ECHEVERRÍA, O., CORONEL, P. & PRIETO, J. 2007. Effects of human albumin and serum on the *in vitro* bactericidal activity of cefditoren against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 60, 156-8.

- SHAPER, M., HOLLINGSHEAD, S. K., BENJAMIN, W. H., JR. & BRILES, D. E. 2004. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun*, 72, 5031-40.
- SHARAPOVA, Y., ŠVEDAS, V. & SUPLATOV, D. 2021. Catalytic and lectin domains in neuraminidase A from *Streptococcus pneumoniae* are capable of an intermolecular assembly: implications for biofilm formation. *FEBS J*, 288, 3217-30.
- SHARON, N. 2007. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*, 282, 2753-64.
- SHARP, J. A., ECHAGUE, C. G., HAIR, P. S., WARD, M. D., NYALWIDHE, J. O., GEOGHEGAN, J. A., FOSTER, T. J. & CUNNION, K. M. 2012. *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One*, 7, e38407.
- SHENOY, A. T., BRISSAC, T., GILLEY, R. P., KUMAR, N., WANG, Y., GONZALEZ-JUARBE, N., HINKLE, W. S., DAUGHERTY, S. C., SHETTY, A. C., OTT, S., TALLON, L. J., DESHANE, J., TETTELIN, H. & ORIHUELA, C. J. 2017. *Streptococcus pneumoniae* in the heart subvert the host response through biofilm-mediated resident macrophage killing. *PLoS Pathog*, 13, e1006582.
- SHOJI, H., VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. A., GONZÁLEZ-DÍAZ, A., CUBERO, M., TUBAU, F., SANTOS, S., GARCÍA-SOMOZA, D., LIÑARES, J., YUSTE, J., MARTÍ, S. & ARDANUY, C. 2018. Overview of pneumococcal serotypes and genotypes causing diseases in patients with chronic obstructive pulmonary disease in a Spanish hospital between 2013 and 2016. *Infect Drug Resist*, 11, 1387-400.
- SHOJI, M. M. & CHEN, A. F. 2020. Biofilms in periprosthetic joint infections: a review of diagnostic modalities, current treatments, and future directions. *J Knee Surg*, 33, 119-31.
- SILVA, M. D. & SILLANKORVA, S. 2019. Otitis media pathogens - A life entrapped in biofilm communities. *Crit Rev Microbiol*, 45, 595-612.
- SIMMONS, W. L. & DYBVIK, K. 2007. Biofilms protect *Mycoplasma pulmonis* cells from lytic effects of complement and gramicidin. *Infect Immun*, 75, 3696-9.
- SINGH, R., SAHORE, S., KAUR, P., RANI, A. & RAY, P. 2016. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathog Dis*, 74, ftw056.
- SINGS, H. L., DE WALS, P., GESSNER, B. D., ISTURIZ, R., LAFERRIERE, C., MCLAUGHLIN, J. M., PELTON, S., SCHMITT, H. J., SUAYA, J. A. & JODAR, L. 2019. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive disease caused by serotype 3 in children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Infect Dis*, 68, 2135-43.
- SINGS, H. L., GESSNER, B. D., WASSERMAN, M. D. & JODAR, L. 2021. Pneumococcal conjugate vaccine impact on serotype 3: a review of surveillance data. *Infect Dis Ther*, 10, 521-39.
- SJÖSTRÖM, J. E., LÖFDAHL, S. & PHILIPSON, L. 1975. Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 123, 905-15.
- SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V., SNEATH, P. H. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*, 30, 225-420..
- SKINNER, D. & KEEFER, C. S. 1941. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch Intern Med*, 68, 851-75.
- SONG, J. H., DAGAN, R., KLUGMAN, K. P. & FRITZELL, B. 2012. The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance. *Vaccine*, 30, 2728-37.
- SONG, J. H., HSUEH, P. R., CHUNG, D. R., KO, K. S., KANG, C. I., PECK, K. R., YEOM, J. S., KIM, S. W., CHANG, H. H., KIM, Y. S., JUNG, S. I., SON, J. S., SO, T. M., LALITHA, M. K., YANG, Y., HUANG, S. G., WANG, H., LU, Q., CARLOS, C. C., PERERA, J. A., CHIU, C. H., LIU, J. W., CHONGTHALEONG, A., THAMLIKITKUL, V. & VAN, P. H. 2011. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J Antimicrob Chemother*, 66, 1061-9.
- SØRENSEN, U. B., HENRICHSEN, J., CHEN, H. C. & SZU, S. C. 1990. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb Pathog*, 8, 325-34.
- SORIANO, F., CAFINI, F., AGUILAR, L., TARRAGÓ, D., ALOU, L., GIMÉNEZ, M. J., GRACIA, M., PONTE, M. C., LEU, D., PANA, M., LETOWSKA, I. & FENOLL, A. 2008. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *J Antimicrob Chemother*, 62, 1234-40.

- SOTO, A., QUIÑONES-LAVERIANO, D. M., VALDIVIA, F., JUSCAMAYTA-LÓPEZ, E., AZAÑERO-HARO, J., CHAMBI, L., HORNA, H., PATIÑO, G., GUZMAN, E. & DE LA CRUZ-VARGAS, J. A. 2021. Detection of viral and bacterial respiratory pathogens identified by molecular methods in COVID-19 hospitalized patients and its impact on mortality and unfavorable outcomes. *Infect Drug Resist*, 14, 2795-807.
- SPAAN, A. N., SCHIEPERS, A., DE HAAS, C. J., VAN HOOIJDONK, D. D., BADIOU, C., CONTAMIN, H., VANDENESCH, F., LINA, G., GERARD, N. P., GERARD, C., VAN KESSEL, K. P., HENRY, T. & VAN STRIJP, J. A. 2015. Differential interaction of the Staphylococcal toxins Panton-Valentine leukocidin and  $\gamma$ -hemolysin CB with human C5a receptors. *J Immunol*, 195, 1034-43.
- SPIJKERMAN, J., PREVAES, S. M., VAN GILS, E. J., VEENHOVEN, R. H., BRUIN, J. P., BOGAERT, D., WIJMENGA-MONSUUR, A. J., VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P. & SANDERS, E. A. 2012. Long-term effects of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*. *PLoS One*, 7, e39730.
- STACEY, H. L., ROSEN, J., PETERSON, J. T., WILLIAMS-DIAZ, A., GAKHAR, V., STERLING, T. M., ACOSTA, C. J., NOLAN, K. M., LI, J., PEDLEY, A., BENNER, P., ABEYGUNAWARDANA, C., KOSINSKI, M., SMITH, W. J., PUJAR, H. & MUSEY, L. K. 2019. Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-15) compared to PCV-13 in healthy older adults. *Hum Vaccin Immunother*, 15, 530-9.
- STÄMPFLI, M. R. & ANDERSON, G. P. 2009. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*, 9, 377-84.
- STANDISH, A. J. & WEISER, J. N. 2009. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol*, 183, 2602-9.
- STEFANI, S., CHUNG, D. R., LINDSAY, J. A., FRIEDRICH, A. W., KEARNS, A. M., WESTH, H. & MACKENZIE, F. M. 2012. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*, 39, 273-82.
- STEIN, K. E. 1992. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis*, 165, S49-S52.
- STERNBERG, G. M. 1881. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull*, 2, 781-3.
- STEVENS, N. T., GREENE, C. M., O'GARA, J. P. & HUMPHREYS, H. 2009. Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis. *J Med Microbiol*, 58, 855-62.
- STEWART, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, 292, 107-13.
- STEWART, P. S. & COSTERTON, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135-8.
- STRINGER, K. A., TOBIAS, M., O'NEILL, H. C. & FRANKLIN, C. C. 2007. Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292, L1572-9.
- STRINGFELLOW, W. T., DASSY, B., LIEB, M. & FOURNIER, J. M. 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl Environ Microbiol*, 57, 618-21.
- STRYJEWSKI, M. E. & COREY, G. R. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin Infect Dis*, 58 Suppl 1, S10-9.
- SUBESINGHE, S., BECHMAN, K., RUTHERFORD, A. I., GOLDBLATT, D. & GALLOWAY, J. B. 2018. A systematic review and metaanalysis of antirheumatic drugs and vaccine immunogenicity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 45, 733-44.
- SUGIMOTO, S., SATO, F., MIYAKAWA, R., CHIBA, A., ONODERA, S., HORI, S. & MIZUNOE, Y. 2018. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 8, 2254.
- SUN, F., LIANG, H., KONG, X., XIE, S., CHO, H., DENG, X., JI, Q., ZHANG, H., ALVAREZ, S., HICKS, L. M., BAE, T., LUO, C., JIANG, H. & HE, C. 2012. Quorum-sensing agr mediates bacterial oxidation response via an intramolecular disulfide redox switch in the response regulator AgrA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 9095-100.
- SYED, S., VIAZMINA, L., MAGER, R., MERI, S. & HAAPASALO, K. 2020. Streptococci and the complement system: interplay during infection, inflammation and autoimmunity. *FEBS Lett*, 594, 2570-85.

- SZALAI, A. J., AGRAWAL, A., GREENHOUGH, T. J. & VOLANAKIS, J. E. 1999. C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clin Chem Lab Med*, 37, 265-70.
- SZWEDA, P., GORCZYCA, G., TYLINGO, R., KURLEND, J., KWIECINSKI, J. & MILEWSKI, S. 2014. Chitosan-protein scaffolds loaded with lysostaphin as potential antistaphylococcal wound dressing materials. *J Appl Microbiol*, 117, 634-42.
- TAGLIALEGNA, A., NAVARRO, S., VENTURA, S., GARNETT, J. A., MATTHEWS, S., PENADES, J. R., LASA, I. & VALLE, J. 2016. Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. *PLoS Pathog*, 12, e1005711.
- TAKATA, Y., KINOSHITA, T., KOZONO, H., TAKEDA, J., TANAKA, E., HONG, K. & INOUE, K. 1987. Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J Exp Med*, 165, 1494-507.
- TALBOT, U. M., PATON, A. W. & PATON, J. C. 1996. Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun*, 64, 3772-7.
- TAN, T. Q. 2012. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Microbiol Rev*, 25, 409-19.
- TEDDER, T. F., STEEBER, D. A., CHEN, A. & ENGEL, P. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*, 9, 866-73.
- TERRASSE, R., TACNET-DELORME, P., MORISCOT, C., PÉRARD, J., SCHOEHN, G., VERNET, T., THIELENS, N. M., DI GUILMI, A. M. & FRACHET, P. 2012. Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. *J Biol Chem*, 287, 42620-33.
- THAKKER, M., PARK, J. S., CAREY, V. & LEE, J. C. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun*, 66, 5183-9.
- THOENDEL, M., KAVANAUGH, J. S., FLACK, C. E. & HORSWILL, A. R. 2011. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev*, 111, 117-51.
- THOMPSON, A., LAMBERTH, E., SEVERS, J., SCULLY, I., TARABAR, S., GINIS, J., JANSEN, K. U., GRUBER, W. C., SCOTT, D. A. & WATSON, W. 2019. Phase 1 trial of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*, 37, 6201-6207.
- THURLOW, L. R., HANKE, M. L., FRITZ, T., ANGLE, A., ALDRICH, A., WILLIAMS, S. H., ENGBRETSSEN, I. L., BAYLES, K. W., HORSWILL, A. R. & KIELIAN, T. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol*, 186, 6585-96.
- TO, H. & NAGAI, S. 2007. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 813-20.
- TOMASZ, A. 1967. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus. *Science*, 157, 694-7.
- TONG, H. H., JAMES, M., GRANTS, I., LIU, X., SHI, G. & DEMARIA, T. F. 2001. Comparison of structural changes of cell surface carbohydrates in the eustachian tube epithelium of chinchillas infected with a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant or its isogenic parent strain. *Microb Pathog*, 31, 309-17.
- TONG, H. H., LI, Y. X., STAHL, G. L. & THURMAN, J. M. 2010. Enhanced susceptibility to acute pneumococcal otitis media in mice deficient in complement C1qa, factor B, and factor B/C2. *Infect Immun*, 78, 976-83.
- TONG, S. Y., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L. & FOWLER, V. G., JR. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28, 603-61.
- TORRES, A., BLASI, F., DARTOIS, N. & AKOVA, M. 2015. Which individuals are at increased risk of pneumococcal disease and why? Impact of COPD, asthma, smoking, diabetes, and/or chronic heart disease on community-acquired pneumonia and invasive pneumococcal disease. *Thorax*, 70, 984-9.
- TÓTHPÁL, A., DESOBRY, K., JOSHI, S. S., WYLLIE, A. L. & WEINBERGER, D. M. 2019. Variation of growth characteristics of pneumococcus with environmental conditions. *BMC Microbiol*, 19, 304.
- TRAPPETTI, C., GUALDI, L., DI MEOLA, L., JAIN, P., KORIR, C. C., EDMONDS, P., IANNELLI, F., RICCI, S., POZZI, G. & OGGIONI, M. R. 2011a. The impact of the competence quorum sensing system on *Streptococcus pneumoniae* biofilms varies depending on the experimental model. *BMC Microbiol*, 11, 75.

- TRAPPETTI, C., OGUNNIYI, A. D., OGGIONI, M. R. & PATON, J. C. 2011b. Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease. *PLoS One*, 6, e19844.
- TRAPPETTI, C., POTTER, A. J., PATON, A. W., OGGIONI, M. R. & PATON, J. C. 2011c. LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 79, 4550-8.
- TRENGOVE, N. J., LANGTON, S. R. & STACEY, M. C. 1996. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen*, 4, 234-9.
- TRENGOVE, N. J., STACEY, M. C., MACAULEY, S., BENNETT, N., GIBSON, J., BURSLEM, F., MURPHY, G. & SCHULTZ, G. 1999. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen*, 7, 442-52.
- TROESE, M. J. & CARLYON, J. A. 2009. Anaplasma phagocytophilum dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect Immun*, 77, 4018-27.
- TSENG, Y. W., CHANG, C. C. & CHANG, Y. C. 2021. Novel virulence role of pneumococcal nana in host inflammation and cell death through the activation of inflammasome and the caspase pathway. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 613195.
- TU, A. H., FULGHAM, R. L., MCCRORY, M. A., BRILES, D. E. & SZALAI, A. J. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 67, 4720-4.
- TUCHSCHERR, L., LÖFFLER, B., BUZZOLA, F. R. & SORDELLI, D. O. 2010. *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiol*, 5, 1823-32.
- UBUKATA, K., NONOGUCHI, R., MATSUHASHI, M. & KONNO, M. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol*, 171, 2882-5.
- UCHIYAMA, S., CARLIN, A. F., KHOSRAVI, A., WEIMAN, S., BANERJEE, A., QUACH, D., HIGHTOWER, G., MITCHELL, T. J., DORAN, K. S. & NIZET, V. 2009. The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med*, 206, 1845-52.
- VAN AALST, M., LANGEDIJK, A. C., SPIJKER, R., DE BREE, G. J., GROBUSCH, M. P. & GOORHUIS, A. 2018. The effect of immunosuppressive agents on immunogenicity of pneumococcal vaccination: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*, 36, 5832-5845.
- VAN DEN BERGH, M. R., BIESBROEK, G., ROSSEN, J. W., DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A., BOSCH, A. A., VAN GILS, E. J., WANG, X., BOONACKER, C. W., VEENHOVEN, R. H., BRUIN, J. P., BOGAERT, D. & SANDERS, E. A. 2012. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLoS One*, 7, e47711.
- VAN DER LINDEN, M., AL-LAHAM, A., NICKLAS, W. & REINERT, R. R. 2009. Molecular characterization of pneumococcal isolates from pets and laboratory animals. *PLoS One*, 4, e8286.
- VAN DER MATEN, E., VAN DEN BROEK, B., DE JONGE, M. I., RENSEN, K. J. W., ELEVELD, M. J., ZOMER, A. L., CREMERS, A. J. H., FERWERDA, G., DE GROOT, R., LANGEREIS, J. D. & VAN DER FLIER, M. 2018. *Streptococcus pneumoniae* PspC subgroup prevalence in invasive disease and differences in contribution to complement evasion. *Infect Immun*, 86, e00010-18.
- VAN DER POLL, T. & OPAL, S. M. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374, 1543-56.
- VAN GILS, E. J., HAK, E., VEENHOVEN, R. H., RODENBURG, G. D., BOGAERT, D., BRUIN, J. P., VAN ALPHEN, L. & SANDERS, E. A. 2011. Effect of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Staphylococcus aureus* colonisation in a randomised controlled trial. *PLoS One*, 6, e20229.
- VAN HAL, S. J., JENSEN, S. O., VASKA, V. L., ESPEDIDO, B. A., PATERSON, D. L. & GOSBELL, I. B. 2012. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Rev*, 25, 362-86.
- VAN HOEK, A. J., ANDREWS, N., WAIGHT, P. A., GEORGE, R. & MILLER, E. 2012. Effect of serotype on focus and mortality of invasive pneumococcal disease: coverage of different vaccines and insight into non-vaccine serotypes. *PLoS One*, 7, e39150.
- VANDEVELDE, N. M., TULKENS, P. M., DIAZ IGLESIAS, Y., VERHAEGEN, J., RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H., PHILIPPART, I., CADROBBI, J., COPPENS, N., BOEL, A., VAN VAERENBERGH, K., FRANCCART, H., VANHOOF, R., LIISTRO, G., JORDENS, P., D'ODEMONT, J. P., VALCKE, Y., VERSCHUREN, F. & VAN BAMBEKE, F. 2014.

- Characterisation of a collection of *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients suffering from acute exacerbations of chronic bronchitis: in vitro susceptibility to antibiotics and biofilm formation in relation to antibiotic efflux and serotypes/serogroups. *Int J Antimicrob Agents*, 44, 209-17.
- VASSALLO, R., KROENING, P. R., PARAMBIL, J. & KITA, H. 2008. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Mol Immunol*, 45, 3321-9.
- VÁZQUEZ, R., CARO-LEÓN, F. J., NAKAL, A., RUIZ, S., DOÑORO, C., GARCÍA, L., VÁZQUEZ-LASA, B., SAN ROMÁN, J., SANZ, J. & GARCÍA, P. 2021. DEAE-chitosan nanoparticles as a pneumococcus-biomimetic material for the development of antipneumococcal therapeutics. *Carbohydr Polym*, 273, 118605.
- VÁZQUEZ, R., GARCÍA, E. & GARCÍA, P. 2018. Phage lysins for fighting bacterial respiratory infections: a new generation of antimicrobials. *Front Immunol*, 9, 2252.
- VAZQUEZ, R. & GARCIA, P. 2019. Synergy between two chimeric lysins to kill *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol*, 10, 1251.
- VESTBY, L. K., GRØNSETH, T., SIMM, R. & NESSE, L. L. 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9, 59.
- VICENTE-MANZANARES, M. & SÁNCHEZ-MADRID, F. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol*, 4, 110-22.
- VIDAL, J. E., HOWERY, K. E., LUDEWICK, H. P., NAVA, P. & KLUGMAN, K. P. 2013. Quorum-sensing systems LuxS/autoinducer 2 and Com regulate *Streptococcus pneumoniae* biofilms in a bioreactor with living cultures of human respiratory cells. *Infect Immun*, 81, 1341-53.
- VIDAL, J. E., LUDEWICK, H. P., KUNKEL, R. M., ZÄHNER, D. & KLUGMAN, K. P. 2011. The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infect Immun*, 79, 4050-60.
- VISANSIRIKUL, S., KOLODZIEJ, S. A. & DEMCHENKO, A. V. 2020. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. *Org Biomol Chem*, 18, 783-98.
- VISSER, L. G. 2011. TNF- $\alpha$  Antagonists and Immunization. *Curr Infect Dis Rep*, 13, 243-7.
- VOLLMER, W. & TOMASZ, A. 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 275, 20496-501.
- VOLLMER, W. & TOMASZ, A. 2001. Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 39, 1610-22.
- VOLLMER, W. & TOMASZ, A. 2002. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 70, 7176-8.
- VOSS, A., LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C. & WULF, M. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis*, 11, 1965-6.
- VOSS, S., HALLSTRÖM, T., SALEH, M., BURCHHARDT, G., PRIBYL, T., SINGH, B., RIESBECK, K., ZIPFEL, P. F. & HAMMERSCHMIDT, S. 2013. The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. *J Biol Chem*, 288, 15614-27.
- VUONG, C., VOYICH, J. M., FISCHER, E. R., BRAUGHTON, K. R., WHITNEY, A. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*, 6, 269-75.
- WAHL, B., O'BRIEN, K. L., GREENBAUM, A., MAJUMDER, A., LIU, L., CHU, Y., LUKŠIĆ, I., NAIR, H., MCALLISTER, D. A., CAMPBELL, H., RUDAN, I., BLACK, R. & KNOLL, M. D. 2018. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Health*, 6, e744-e757.
- WRIGHT, P. A., ANDREWS, N. J., LADHANI, S. N., SHEPPARD, C. L., SLACK, M. P. & MILLER, E. 2015. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 15, 535-43.
- WAITE, R. D., STRUTHERS, J. K. & DOWSON, C. G. 2001. Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes high-frequency phase variation. *Mol Microbiol*, 42, 1223-32.

- WALDVOGEL, F. A. 1990. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell, G.L., Bennett, J. E. and Dolin, R., Eds., Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2069-2092.
- WALPORT, M. J. 2001a. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344, 1058-66.
- WALPORT, M. J. 2001b. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*, 344, 1140-4.
- WANG, J. T., LIAO, C. H., FANG, C. T., CHIE, W. C., LAI, M. S., LAUDERDALE, T. L. & CHANG, S. C. 2010. Incidence of and risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquired infection or colonization in intensive-care-unit patients. *J Clin Microbiol*, 48, 4439-44.
- WANG, R., BRAUGHTON, K. R., KRETSCHMER, D., BACH, T. H., QUECK, S. Y., LI, M., KENNEDY, A. D., DORWARD, D. W., KLEBANOFF, S. J., PESCHEL, A., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*, 13, 1510-4.
- WATERS, E. M., ROWE, S. E., O'GARA, J. P. & CONLON, B. P. 2016. Convergence of *Staphylococcus aureus* persister and biofilm research: can biofilms be defined as communities of adherent persister cells? *PLoS Pathog*, 12, e1006012.
- WATTS, A., KE, D., WANG, Q., PILLAY, A., NICHOLSON-WELLER, A. & LEE, J. C. 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect Immun*, 73, 3502-11.
- WEEKS, J. R., STAPLES, K. J., SPALLUTO, C. M., WATSON, A. & WILKINSON, T. M. A. 2021. The role of non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 720742.
- WEICHSELBAUM, A. J. M. J. 1886. Ueber die aetiologie der acuten lungen- und ippenfellentzündungen. *Med Jahrb*, 82, 483-554
- WEILER, J. M., DAHA, M. R., AUSTEN, K. F. & FEARON, D. T. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein  $\beta$ 1H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 3268-72.
- WEIMER, K. E., ARMBRUSTER, C. E., JUNEAU, R. A., HONG, W., PANG, B. & SWORDS, W. E. 2010. Coinfection with *Haemophilus influenzae* promotes pneumococcal biofilm formation during experimental otitis media and impedes the progression of pneumococcal disease. *J Infect Dis*, 202, 1068-75.
- WEINBERGER, D. M., MALLEY, R. & LIPSITCH, M. 2011. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*, 378, 1962-73.
- WEINBERGER, D. M., TRZCINSKI, K., LU, Y. J., BOGAERT, D., BRANDES, A., GALAGAN, J., ANDERSON, P. W., MALLEY, R. & LIPSITCH, M. 2009. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog*, 5, e1000476.
- WEINRICK, B., DUNMAN, P. M., MCALEESE, F., MURPHY, E., PROJAN, S. J., FANG, Y. & NOVICK, R. P. 2004. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 186, 8407-23.
- WEISER, J. N., AUSTRIAN, R., SREENIVASAN, P. K. & MASURE, H. R. 1994. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun*, 62, 2582-9.
- WEISER, J. N., BAE, D., FASCHING, C., SCAMURRA, R. W., RATNER, A. J. & JANOFF, E. N. 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4215-20.
- WEISER, J. N., FERREIRA, D. M. & PATON, J. C. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*, 16, 355-367.
- WELP, A. L. & BOMBERGER, J. M. 2020. Bacterial community interactions during chronic respiratory disease. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 213.
- WERTHEIM, H. F., MELLES, D. C., VOS, M. C., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. A. & NOUWEN, J. L. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 5, 751-62.
- WERTHEIM, H. F., VOS, M. C., OTT, A., VAN BELKUM, A., VOSS, A., KLUYTMANS, J. A., VAN KEULEN, P. H., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., MEESTER, M. H. & VERBRUGH, H. A. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*, 364, 703-5.
- WILKINSON, B. (ed.) 1997. *The staphylococci in human disease*, London: Churchill Livingstone.

- WOEHL, J. L., STAPELS, D. A. C., GARCIA, B. L., RAMYAR, K. X., KEIGHTLEY, A., RUYKEN, M., SYRIGA, M., SFYROERA, G., WEBER, A. B., ZOLKIEWSKI, M., RICKLIN, D., LAMBRIS, J. D., ROOIJAKKERS, S. H. M. & GEISBRECHT, B. V. 2014. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase. *J Immunol*, 193, 6161-71.
- WOLCOTT, R., COSTERTON, J. W., RAOULT, D. & CUTLER, S. J. 2013. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect*, 19, 107-12.
- WOLCOTT, R. D. & EHRlich, G. D. 2008. Biofilms and chronic infections. *JAMA*, 299, 2682-4.
- WOLSKA, K. I., GRUDNIAK, A. M., RUDNICKA, Z. & MARKOWSKA, K. 2016. Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet*, 57, 225-38.
- WOTTON, C. J. & GOLDACRE, M. J. 2012. Risk of invasive pneumococcal disease in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record linkage cohort analyses. *J Epidemiol Community Health*, 66, 1177-81.
- WRIGHT, A., MORGAN, W. P., COLEBROOK, L. & DODGSON, R. 1914. Observations on prophylactic inoculation against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. *Lancet*, 183, 1-10.
- WU, X., GORDON, O., JIANG, W., ANTEZANA, B. S., ANGULO-ZAMUDIO, U. A., DEL RIO, C., MOLLER, A., BRISSAC, T., TIERNEY, A. R. P., WARNCKE, K., ORIHUELA, C. J., READ, T. D. & VIDAL, J. E. 2019. Interaction between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* generates ( $\cdot$ )OH radicals that rapidly kill *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol*, 201, e00474-19.
- WU, X., JACOBS, N. T., BOZIO, C., PALM, P., LATTAR, S. M., HANKE, C. R., WATSON, D. M., SAKAI, F., LEVIN, B. R., KLUGMAN, K. P. & VIDAL, J. E. 2017. Competitive dominance within biofilm consortia regulates the relative distribution of pneumococcal nasopharyngeal density. *Appl Environ Microbiol*, 83, e00953-17.
- WYLLIE, D. H., PETO, T. E. & CROOK, D. 2005. MRSA bacteraemia in patients on arrival in hospital: a cohort study in Oxfordshire 1997-2003. *BMJ*, 331, 992.
- XIONG, Y. Q., WILLARD, J., YEAMAN, M. R., CHEUNG, A. L. & BAYER, A. S. 2006. Regulation of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin gene (*hla*) expression by *agr*, *sarA*, and *sae* *in vitro* and in experimental infective endocarditis. *J Infect Dis*, 194, 1267-75.
- XU, Q., ZHANG, J. W., CHEN, Y., LI, Q. & JIANG, Y. L. 2019. Crystal structure of the choline-binding protein CbpJ from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 514, 1192-7.
- XU, X., MENG, J., WANG, Y., ZHENG, J., WU, K., ZHANG, X., YIN, Y. & ZHANG, Q. 2014. Serotype-independent protection against pneumococcal infections elicited by intranasal immunization with ethanol-killed pneumococcal strain, SPY1. *J Microbiol*, 52, 315-23.
- XU, Y., MA, M., IPPOLITO, G. C., SCHROEDER, H. W., JR., CARROLL, M. C. & VOLANAKIS, J. E. 2001. Complement activation in factor D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14577-82.
- YAGETA, Y., ISHII, Y., MORISHIMA, Y., MASUKO, H., ANO, S., YAMADORI, T., ITOH, K., TAKEUCHI, K., YAMAMOTO, M. & HIZAWA, N. 2011. Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice. *J Virol*, 85, 4679-90.
- YAMADA, M., WATANABE, T., MIYARA, T., BABA, N., SAITO, J., TAKEUCHI, Y. & OHSAWA, F. 2007. Crystal structure of cefditoren complexed with *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2X: structural basis for its high antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3902-7.
- YAMAGUCHI, M., GOTO, K., HIROSE, Y., YAMAGUCHI, Y., SUMITOMO, T., NAKATA, M., NAKANO, K. & KAWABATA, S. 2019. Identification of evolutionarily conserved virulence factor by selective pressure analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *Commun Biol*, 2, 96.
- YAMASHITA, K., KAWAI, Y., TANAKA, Y., HIRANO, N., KANEKO, J., TOMITA, N., OHTA, M., KAMIO, Y., YAO, M. & TANAKA, I. 2011. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin reveals the  $\beta$ -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 17314-9.
- YANG, Q., XU, Y., CHEN, M., WANG, H., SUN, H., HU, Y., ZHANG, R., DUAN, Q., ZHUO, C., CAO, B., LIU, Y., YU, Y., SUN, Z. & CHU, Y. 2012. In vitro activity of cefditoren and other comparators against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* causing community-acquired respiratory tract infections in China. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73, 187-91.
- YARWOOD, J. M., BARTELS, D. J., VOLPER, E. M. & GREENBERG, E. P. 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*, 186, 1838-50.

- YOONG, P. & TORRES, V. J. 2013. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol*, 16, 63-9.
- YUSTE, J., BOTTO, M., BOTTOMS, S. E. & BROWN, J. S. 2007. Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*, 3, 1208-19.
- YUSTE, J., KHANDAVILLI, S., ANSARI, N., MUTTARDI, K., ISMAIL, L., HYAMS, C., WEISER, J., MITCHELL, T. & BROWN, J. S. 2010. The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. *Infect Immun*, 78, 283-92.
- ZAPOTOCZNA, M., O'NEILL, E. & O'GARA, J. P. 2016. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS Pathog*, 12, e1005671.
- ZATORSKA, B., GROGER, M., MOSER, D., DIAB-ELSCHAHAWI, M., LUSIGNANI, L. S. & PRESTERL, E. 2017. Does extracellular DNA production vary in *Staphylococcal* biofilms isolated from infected implants versus controls? *Clin Orthop Relat Res*, 475, 2105-13.
- ZHANG, F., LU, Y. J. & MALLEY, R. 2013. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 13564-9.
- ZHANG, J. R., MOSTOV, K. E., LAMM, M. E., NANNO, M., SHIMIDA, S., OHWAKI, M. & TUOMANEN, E. 2000. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell*, 102, 827-37.
- ZHANG, L., JACOBSSON, K., STRÖM, K., LINDBERG, M. & FRYKBERG, L. 1999. *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and  $\beta_2$ -glycoprotein I. *Microbiology*, 145 ( Pt 1), 177-183.
- ZHANG, Y., MASI, A. W., BARNIAK, V., MOUNTZOUROS, K., HOSTETTER, M. K. & GREEN, B. A. 2001. Recombinant PhpA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal challenge. *Infect Immun*, 69, 3827-36.
- ZIEBANDT, A. K., WEBER, H., RUDOLPH, J., SCHMID, R., HÖPER, D., ENGELMANN, S. & HECKER, M. 2001. Extracellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of SarA and sigma B. *Proteomics*, 1, 480-93.
- ZIELINSKA, A. K., BEENKEN, K. E., MRAK, L. N., SPENCER, H. J., POST, G. R., SKINNER, R. A., TACKETT, A. J., HORSWILL, A. R. & SMELTZER, M. S. 2012. sarA-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* USA300 isolates. *Mol Microbiol*, 86, 1183-96.
- ZIPFEL, P. F., WÜRZNER, R. & SKERKA, C. 2007. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol*, 44, 3850-7.
- ZIPPERER, A., KONNERTH, M. C., LAUX, C., BERSCHIED, A., JANEK, D., WEIDENMAIER, C., BURIAN, M., SCHILLING, N. A., SLAVETINSKY, C., MARSCHAL, M., WILLMANN, M., KALBACHER, H., SCHITTEK, B., BRÖTZ-OESTERHELT, H., GROND, S., PESCHEL, A. & KRISMER, B. 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 535, 511-6.
- ZUO, L., HE, F., SERGAKIS, G. G., KOOZEHCHEAN, M. S., STIMPFL, J. N., RONG, Y., DIAZ, P. T. & BEST, T. M. 2014. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, L205-18.



## ANEXO I: PUBLICACIONES DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS

- DOMENECH, M., **SEMPERE, J.**, DE MIGUEL, S. & YUSTE, J. 2018. Combination of antibodies and antibiotics as a promising strategy against multidrug-resistant pathogens of the respiratory tract. *Front Immunol*, 9, 2700.
- SEMPERE, J.**, DE MIGUEL, S., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., YUSTE, J. & DOMENECH, M. 2020. clinical relevance and molecular pathogenesis of the emerging serotypes 22F and 33F of *Streptococcus pneumoniae* in Spain. *Front Microbiol*, 11,309.
- DE MIGUEL, S.\*, DOMENECH, M.\*, GONZÁLEZ-CAMACHO, F., **SEMPERE, J.**, VICIOSO, D., SANZ, J. C., GARCÍA COMAS, L., ARDANUY, C., FENOLL, A. & YUSTE, J. 2020. Nationwide trends of invasive pneumococcal disease in Spain from 2009 through 2019 in children and adults during the pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis*, 29, ciaa1483.
- SEMPERE, J.**, LLAMOSÍ, M., DEL RÍO MENÉNDEZ, I., LÓPEZ RUIZ, B., DOMENECH, M. & GONZÁLEZ-CAMACHO, F. 2021a. Pneumococcal choline-binding proteins involved in virulence as vaccine candidates. *Vaccines*, 9, 181.
- SEMPERE, J.\***, GONZÁLEZ-CAMACHO, F.\*, DOMENECH, M.\*, LLAMOSÍ, M., DEL RIO, I., LOPEZ-RUIZ, B., GIMENO, M., CORONEL, P. & YUSTE, J. 2022. A national longitudinal study evaluating the activity of cefditoren and other antibiotics against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* strains during the period 2004–2020 in Spain. *J Antimicrob Chemother*, dkab482.
- SEMPERE, J.**, LLAMOSÍ, M., ROMAN, F., PÉREZ-GARCÍA, C., LAGO, D., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., YUSTE, J.†, & DOMENECH, M.‡ 2022b. Clearance of mixed biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and methicillin-susceptible/resistant *Staphylococcus aureus* by antioxidants *N*-acetyl-L-cysteine and cysteamine. *Sci Rep*. **In revision.**
- LLAMOSÍ, M.\*, **SEMPERE, J.\***, LOPEZ-RUIZ, B., DEL RIO, I., PÉREZ-GARCÍA, C., LAGO, D., GONZÁLEZ-CAMACHO, F., GIMENO, M., CORONEL, P., DOMENECH, M.‡ & YUSTE, J.‡ 2022. Impact of pneumococcal conjugate vaccines and SARS-CoV-2 on antimicrobial resistance in Spain during the period 2004-2020 alerts the emergence of *S. pneumoniae* serotypes with reduced susceptibility. *Lancet Microb*. **In revision.**