

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



TESIS DOCTORAL

**Nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas
frente a la infección por *Streptococcus
pneumoniae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Bruno Corsini Carvalho

DIRECTOR

José Enrique Yuste Lobo

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



**NUEVAS ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS Y
TERAPÉUTICAS FRENTE A LA INFECCIÓN
POR *Streptococcus pneumoniae***

**TESIS DOCTORAL
BRUNO CORSINI CARVALHO**



MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II

**NUEVAS ESTRATEGIAS
PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS
FRENTE A LA INFECCIÓN POR
*Streptococcus pneumoniae***

Tesis doctoral presentada por

Bruno Corsini Carvalho

**para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid**

Director:

Dr. José Enrique Yuste Lobo

Instituto de Salud Carlos III

MADRID, 2016

A mis amores,

Rita de Cássia Corsini y Pietro Corsini

“Nunca dejes que nadie te diga que no puedes hacer algo. Ni siquiera yo. Si tienes un sueño, ve a por él. La gente que no lo consiguió, te dirá que no lo lograrás, pero si tienes un sueño persíguelo y punto”.

Will Smith

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) (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html#nt>), en esta tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

A, absorbancia.

Alum: hidróxido de aluminio (Alhydrogel).

AMP, ampicilina.

AMX, amoxicilina

ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo.

BSA, seroalbúmina bovina.

C4BP, proteína de unión al factor C4b del complemento.

CBD, dominio de unión a colina.

CBP, proteína de unión a colina.

CBR, secuencia repetida con capacidad de unión a colina.

CDC, citolisinas dependientes de colesterol.

CLSI, Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico.

CLSM, microscopía de barrido láser confocal.

CMI, concentración mínima inhibitoria.

CPS, cápsula neumocócica o polisacárido capsular.

CRP, proteína C-reactiva.

CTX, cefotaxima.

CW_7, repetición de unión a sustrato de Cpl-7.

DAMP, patrones moleculares asociados a la lesión.

DEAE, dietilaminoetanol (o dietilaminoetil-).

DO, densidad óptica.

Doc, desoxicolato sódico.

ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

ENI, enfermedad neumocócica invasiva.

FAM-SE, 5,6-carboxifluoresceína, succidinimil éster.

fH, factor H del sistema del complemento.

fI, factor I del sistema del complemento.

FITC, isotiocianato de fluoresceína.

HBSS, tampón salino de Hank.

IN, intranasal.

ISCI: Instituto de Salud Carlos III

IP, intraperitoneal.

IPTG, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

IRF, índice relativo de fluorescencia.

LP, lipoproteína.

LTA, ácido(s) lipoteicoico(s).

MAC, complejo de ataque a membrana del sistema del complemento.

MBL, lectina de unión a manosa.

MDL, mínima dosis letal
NAM-amidasa, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.
NIH, Instituto Nacional de la Salud de EE.UU.
NLR, receptor tipo NOD.
OMS, Organización Mundial de la Salud.
Opt, optoquina.
PAF, factor de activación plaquetaria.
PAFR, receptor del factor activador de plaquetas
PAGE, electroforesis en gel(es) de poliacrilamida.
PAMP, patrón molecular asociado a microorganismos patógenos.
PCho, fosforilcolina.
PCV7/10/13, vacuna neumocócica conjugada 7-, 10- o 13-valente.
PEN, penicilina.
PFA, paraformaldehído.
PlgR, receptor de las inmunoglobulinas poliméricas.
PPSV14/23, vacuna neumocócica polisacáridica 14- o 23-valente.
PRR, receptores de reconocimiento de patrones.
^R, resistente.
SAP, componente amiloide del suero.
SBF, suero bovino fetal.
SDS, dodecilsulfato sódico.
SGM, estreptococos del grupo mitis.
SP, tampón fosfato sódico 20 mM; ajustado a pH 6.9.
TA, ácido(s) teicoico(s).
Tampón TE, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM.
THY, Todd Hewitt con extracto de levadura
TLR, receptor tipo Toll.
UFC, unidades formadoras de colonias.
VAN, vancomicina.

ÍNDICE

SUMMARY	i
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. HISTORIA NATURAL DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	3
1.1. Aspectos históricos	3
1.2. Características generales	3
1.3. Importancia epidemiología y clínica	5
1.4. Factores de virulencia	6
1.4.1. La capsula polisacáridica	7
1.4.2. La pared celular	9
1.4.3. Proteínas de superficie	9
1.4.3.1 Neumolisina (Ply).....	10
1.4.3.2 Proteína A de superficie neumocócica (PspA).....	11
1.4.3.3 Proteína C de superficie neumocócica (PspC).....	11
1.4.3.4 Autolisina (LytA).....	11
1.4.3.5 Glucosaminidasa (LytB).....	12
1.4.3.6 Antígeno A de superficie neumocócica (PsaA).....	13
1.4.3.7 Lipoproteínas PiuA y PiaA.....	13
1.4.3.8 Proteínas de la triadas de histidina (Pht).....	14
1.4.3.9 Proteínas de superficie dependientes de sortasa.....	14
2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	14
2.1. Adhesión y colonización nasofaríngea	15
2.2. Invasión	16
3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR	17
3.1 Inmunidad humoral	17
3.1.1 Sistema del complemento	17
3.1.2 La vía clásica	18

3.1.3 La vía alternativa	18
3.1.4 La vía de las lectinas	19
3.1.5. Oponofagocitosis	19
4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	20
4.1. Prevención	20
4.1.1. Perspectiva histórica	20
4.1.2. Vacunas constituidas por polisacáridos capsulares.....	21
4.1.3. Vacunas conjugadas	21
4.1.4. Proteínas neumocócicas como antígeno vacunales	22
4.1.4.1 Neumolisina	22
4.1.4.2 Proteína A de superficie neumocócica	23
4.1.4.3 Proteína C de superficie neumocócica	24
4.1.4.4 Autolisina.....	24
4.1.4.5 Glucosaminidasa.....	24
4.1.4.6 Antígeno A de superficie neumocócica	25
4.1.4.7 Lipoproteínas PiuA y PiaA.....	25
4.1.4.8 Proteínas de la triadas de histidina.....	25
4.1.4.9 Proteínas de superficie dependientes de sortasa.....	26
4.2. Tratamiento.....	26
4.2.1. Las lisozimas, un tipo de mureín-hidrolasas	26
4.2.2. Lisozimas presentes en <i>S. pneumoniae</i> y sus bacteriófagos.....	26
4.3 Lisozimas con actividad antineumocócica.....	27
4.3.1. Fagoterapia y enzibióticos	28
5. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	30
II. OBJETIVOS	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	37
1.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos y anticuerpos	37
1.2. Medios y condiciones de cultivo	40

1.3. Reactivos y productos	41
1.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	41
2. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS.....	41
2.1. Producción y purificación de proteínas.....	41
2.2. Cuantificación de proteínas	42
2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	43
2.4. Tinción de proteínas con azul de Coomassie coloidal	43
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	43
3.1. Preparación de DNA cromosómico.....	43
3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	44
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del gen <i>lytB</i>	44
4. CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LytB DE <i>S. PNEUMONIAE</i>.....	44
4.1. Obtención de sueros inmunes frente a la proteína LytB de neumococo para estudiar la respuesta inmunológica.....	44
4.2. Determinación de los niveles de Inmunoglobulinas G y subclases en el suero de los animales inmunizados frente a la proteína LytB.....	44
5. ENSAYO DE INTERACCIÓN CON EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	45
5.1. Activación de la vía clásica del complemento	45
5.2. Reconocimiento por el componente C3b del complemento	45
6. OPSONOFAGOCITOSIS	46
6.1. Marcaje de <i>S. pneumoniae</i> con FAM-SE.....	46
6.2. Fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares	46
7. CARACTERIZACIÓN DE LA MORFOLÓGIA DE NEUMOCOCO EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A LytB.....	47
8. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	47
8.1. Determinación de la mínima dosis letal	48
8.2. Pauta de inmunización para la obtención de suero con anticuerpos frente a LytB.....	48
8.3. Modelos murinos de protección frente a la enfermedad neumocócica	49
8.3.1 Modelo de protección en ratones frente a la neumonía neumocócica.....	49
8.3.2. Modelo de protección en ratones frente a la sepsis neumocócica	50
9. FAGOTERAPIA.....	51
9.1. Capacidad de los enzibióticos para eliminar a los neumococos adheridos al tracto	51

respiratorio	
9.1.1. Microscopía confocal.....	52
9.2. Capacidad de los enzibióticos para erradicar el estado de portador en un modelo murino de colonización de nasofaringe.....	52
9.3. Combinación de enzibióticos y antibióticos de amplio espectro frente a la sepsis neumocócica en un modelo murino.....	53
IV. RESULTADOS.....	55
1. LA UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA LytB DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> COMO POSIBLE ANTÍGENO VACUNAL FRENTE A LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA INVASIVA.....	57
1.1 Cuantificación de inmunoglobulinas totales y subtipos en sueros de ratones BALB/c después de inmunización con LytB.....	57
1.2. Caracterización de la activación del sistema del complemento mediada por anticuerpos anti-LytB.....	58
1.3. La inmunización con LytB induce la opsonofagocitosis de <i>S. pneumoniae</i>	61
1.4. Los anticuerpos anti-LytB aumenta la longitud bacteriana.....	63
1.5. La vacunación con LytB no afecta a la proporción de linfocitos T.....	64
1.6. La inmunización con LytB protege a los ratones frente la infección por <i>S. pneumoniae</i>	65
1.6.1 Protección frente a la neumonía neumocócica invasiva	65
1.6.2 Modelo murino de sepsis neumocócica.....	67
1.7. Análisis molecular de las proteínas LytB de los diferentes aislados de <i>S. pneumoniae</i>	69
2. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS UTILIZANDO ENZIMAS LÍTICAS PARA REDUCIR LA COLONIZACIÓN NEUMOCÓCICA DEL TRACTO RESPIRATORIO.....	71
2.1. Concentración mínima inhibitoria de los antibióticos convencionales y de las enzimas Cpl-1, Cpl-7S, Cpl-711 frente a los 3 aislados clínicos del estudio.....	71
2.2 Efecto de la amoxicilina sobre la adhesión celular al epitelio respiratorio.....	72
2.3 Actividad bactericida de los diferentes enzibióticos frente a la colonización de la nasofaringe humana.....	74
2.4 La utilización de enzibióticos reduce la adhesión de neumococo a las células epiteliales del pulmón.....	77
2.5 Papel de los enzibióticos del estudio para reducir el estado de portador en un modelo animal de colonización de nasofaringe	80
2.6 Combinación de enzimas líticas y antibióticos frente a la enfermedad neumocócica invasiva.....	82
V. DISCUSIÓN.....	85
VI. CONCLUSIONES.....	103
VII. BIBLIOGRAFIA.....	107

SUMMARY

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is one of the leading etiologic agents of community-acquired pneumonia, sepsis and bacterial meningitis particularly affecting children and elderly adults (Koedel et al., 2002; van der Poll y Opal, 2009). More than 25% of the 57 million annual deaths worldwide are estimated to be directly related to infectious diseases. Particularly, respiratory infections are responsible of the death of 4 million people every year. According to World Health Organization (WHO) estimates of sepsis or pneumonia in neonates and pneumonia in older children accounted for 29% of the 10.6 million yearly deaths in children younger than 5 years (10% and 19%, respectively), being *Streptococcus pneumoniae* the most common cause of severe pneumonia among children in developing countries as well as in children and adults in Europe and the United States (O'Brien et al., 2009). Overall, the mortality rate of pneumococcal infections is higher than that originated by any other pathogenic bacteria. As a consequence, WHO and organizations such as the Wellcome Trust and the Bill & Melinda Gates Foundation consider the pneumococcal disease as a global burden.

Prevention of invasive pneumococcal disease (IPD) is one of the leading priorities in public health due to the high morbidity and mortality rates worldwide, especially in children in developing countries (O'Brien et al., 2009). Immunization is a safe and highly efficient approach for preventing IPD. Activation of complement cascades by specific antibodies, leads to the formation of the key component C3b that is crucial in host defence against pneumococcus by coating the microorganism and stimulating phagocytosis. Current prophylactic measures against pneumococcal infection are based on polysaccharide-containing vaccines that may be conjugated to a carrier protein in order to elicit protection in children (O'Brien y Levine, 2006). However, one of the major disadvantages of these polysaccharide vaccines is the extensive variability among the pneumococcal population with up to 96 different capsular polysaccharides (CPS) described to date (Park et al., 2015). An additional limitation is that capsular switching appeared after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines (PCVs), which results in a serious concern because these strains may emerge by avoiding vaccine-induced immunity due to acquisition of capsula genes from non-vaccine serotypes (Aguinagalde et al., 2015; Brueggemann et al., 2007; Golubchik et al., 2012). To circumvent these problems, efforts are being made to investigate *S. pneumoniae* protein-based candidate vaccines that may protect against different serotypes. One of the major goals of this Thesis was to characterize the cell wall hydrolase LytB of *S. pneumoniae* as a potential vaccine candidate. LytB is located at sites close to the polar ends of the cell and is surface exposed. This enzyme has N-acetylglucosaminidase activity and plays an essential role in daughter cell separation (De las Rivas et al., 2002; García et al., 1999).

In terms of pathogenesis, LytB participates in biofilm formation, attachment to human epithelial cells and contributes to sepsis and pneumonia by increasing the ability of LytC to avoid complement-mediated immunity and phagocytosis (Bai et al., 2014; Moscoso et al., 2006; Ramos-Sevillano et al., 2011). From the prophylactic perspective, LytB might be a promising target for the development of a universal pneumococcal vaccine because an anti-LytB antiserum significantly protected mice from a lethal challenge with different pneumococcal strains (Wizemann et al., 2001).

Despite appropriate antibiotic treatment, IPD is associated to high rates of morbidity and mortality worldwide. A major threat to fight IPD is the appearance of strains resistant to high levels of different antibiotic. In cases where the invading pathogen displays multidrug resistance, antimicrobial concentrations in serum may be insufficient and, therefore, the outcome of the infection will largely depend on the interaction between bacterial virulence factors and host immune mechanisms.

Asymptomatic carriage is the prerequisite of all these infections and is more frequently associated to early childhood (Bogaert et al., 2004). Successful colonization of the upper respiratory tract is critical for horizontal spread and may lead to the progression of the infection

process being invasive pneumococcal disease (IPD) the most severe clinical manifestation (Bogaert et al., 2004; O'Brien et al., 2009). In addition, microbial colonization of the lower respiratory tract is associated to chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in which exacerbations and airway inflammation are important aspects related to persistent pneumococcal infections within these patients (Park et al., 2015). Antimicrobial treatment using purified phage-encoded lysins (also known as enzybiotics) is an alternative to current antibiotics to clear bacterial infections as lysins kill susceptible bacteria by breaking specific peptidoglycan bonds and, thus, triggering osmotic lysis (Hermoso et al., 2007; Pastagia et al., 2013). This kind of therapy has been shown to be effective against a wide variety of pneumococcal infections and has the advantage of marked specificity for its bacterial target (Grandgirard et al., 2008; Hermoso et al., 2007; Jado et al., 2003; Pastagia et al., 2013; Witzenrath et al., 2009).

In this Thesis, we have investigated the ability of three lysins termed Cpl-1, Cpl-7S and Cpl-711 (Díez-Martínez et al., 2015) to reduce the colonization by *S. pneumoniae* using human epithelial cell lines and a mouse model of nasopharyngeal colonization. The therapeutic use of enzybiotics against chronic bacterial infections affecting the respiratory tract is relatively unexplored. Nasopharyngeal carriage by *S. pneumoniae* is essential for the pathogenesis process because is a prerequisite for invasive disease (Kadioglu et al., 2008). Strategies based on the clearance of *S. pneumoniae* from the nasopharynx, especially in children, are promising alternatives because they may prevent the progression of the infection (Bogaert et al., 2004). In COPD patients, *S. pneumoniae* is one of the most frequent pathogens causing acute exacerbations and recurrent pneumonia episodes (Sethi y Murphy, 2008). From the clinical perspective, this situation is even worse as persistent pneumococcal isolates from COPD patients are frequently antibiotic-resistant which might compromise the outcome of the infection (Domenech et al., 2011; Pérez-Trallero et al., 2011). As phage lysins kill bacteria very rapidly, just in contact, the use of these lytic enzymes may reduce bacterial attachment to epithelial cells of the upper and lower respiratory tracts. This antimicrobial approach might be a potential strategy to diminish the colonization process and even to clear persistent bacteria in chronic respiratory infections.

Principal findings: In this study, we have characterized the immunological responses and the protective effect of the cell wall hydrolase LytB as a promising pneumococcal protein vaccine. LytB, despite showing certain polymorphism in the number of choline-binding repeats, is a well-conserved protein among *S. pneumoniae* clinical isolates. Sequence analysis of the LytB glucosaminidase from the two clinical isolates of this study were compared to LytBD39 and LytBTIGR4. Our results show that the LytB of the clinical isolate of serotype 3 lacks two choline-binding repeats compared to the LytB of strains 48 (serotype 23F) and D39 (serotype 2). However, the LytB of strains 48 and D39 are very similar. Immunization was performed using alhydrogel as adjuvant or with LytB mixed with alhydrogel since this adjuvant has been approved for human use in studies evaluating pneumococcal proteins. Vaccination with LytB induced a strong IgG response of different subclasses including IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. This is important because some of these subtypes of IgGs are elicited by current human vaccine formulations such as the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV) and PCVs. In this regard, the antibody response conferred by PPSV is predominantly of the IgG2 subclass. The magnitude of the serotype-specific IgG response to PCVs varies by serotype, vaccine formulation and age. In adults, PCVs induce primarily an IgG2 response whereas in children the predominant response is of the IgG1 subclass. The specific IgG subclass generated is relevant from the functional perspective as IgG1 and IgG3 antibodies fix complement and bind Fc γ receptors more efficiently than IgG2. Immunization with LytB induced high levels of these immunoglobulins suggesting that antibodies to this protein might activate complement-mediated phagocytosis. In this sense, differences in the expression of Ig isotypes between human and mice have been previously reported and direct correlation between subtypes within classes in these species are difficult to make because they are not directly equivalent. However, despite the difficulty in comparing the findings derived from studies of murine Ig responses to humans, these studies can be useful in the characterization of novel protein antigens for vaccine development by increasing the understanding of protective immune mechanisms against pneumococcal infection.

Experiments exploring complement activation on the surface of two different clinical isolates demonstrated that antibodies to LytB increased the recognition by C1q and C3b demonstrating that vaccination with LytB triggers classical pathway activation. This is critical in terms of pneumococcal infection as this pathway has been shown to be vital for complement activation to *S. pneumoniae* in humans and mice. Host defense against pneumococcus depends on opsonophagocytosis with neutrophils the important players in the immune response, as neutropenia is highly associated to increased susceptibility to pneumococcal infection. In this study, using a cell line differentiated into neutrophils, we show that immunization with LytB increased complement-mediated phagocytosis confirming that antibodies to LytB activate the phagocytosis process against *S. pneumoniae*. Generation of an IgG3 response by LytB immunization may be relevant against systemic infection as this immunoglobulin is highly protective against a fatal pneumococcal infection. An additional explanation for the increased complement-dependent phagocytosis mediated by antibodies to LytB is due to morphological changes they induce in bacteria. This is important because LytB is essential for cellular separation at the end of cell division as pneumococcal strains lacking LytB form long chains instead of typical diplococci. This is relevant because chain formation in *S. pneumoniae* via antibody-mediated agglutination has been shown to be important to enhance complement-mediated recognition and phagocytosis. Our results show that antibodies to LytB increased bacterial size inducing chaining, which is compatible with enhanced susceptibility to complement-mediated phagocytosis and impaired virulence.

The protective role of LytB was explored in murine models of sepsis and pneumonia. Vaccination with LytB protected against pneumococcal sepsis and invasive pneumonia caused by clinical isolates of serotypes 3 or 23F. Hence, the presence of antibodies to LytB controlled bacterial replication in the bloodstream reducing the severity of the infection process in both serotypes. This is relevant from the prophylactic perspective of serotype 3 strains as IPD cases due to this serotype have not decreased after the introduction of the current PCVs. Furthermore, lack of clinical efficacy against serotype 3 isolates following PCV administration has been associated to impaired immune response and the abundance of CPS produced by these strains. In addition, the relative failure of protection induced by current PCV-13 against serotype 3 isolates has been recently linked to the release of type 3 CPS by these isolates interfering with antibody-mediated killing and protection by anti-CPS antibodies. In this sense, our study shows that immunization with LytB increased complement-mediated phagocytosis and bacterial clearance in the systemic circulation, protecting against pneumococcal sepsis and pneumonia caused by a serotype 3 strain. The results of this Thesis suggest that LytB is a promising vaccine candidate to be considered perhaps in a combined cocktail with other antigens, as combinations of pneumococcal proteins can provide additive or synergistic effects that may be beneficial. Alternatively, the use of LytB as a carrier protein for type 3 CPS might be a prophylactic strategy to increase the immunogenicity against this serotype as combinations of pneumococcal proteins conjugated to CPS included in PCVs are being evaluated. Overall, our study confirms the potential benefit of LytB as a protein vaccine antigen against pneumococcal pneumonia and invasive disease.

The use of purified bacteriophage-encoded lytic enzymes is an alternative therapeutic strategy for the prevention and control of diseases caused by Gram-positive bacteria including *S. pneumoniae*. In the current study we have investigated the antimicrobial activity of three enzybiotics against multidrug resistant (MDR) pneumococcal strains colonizing the upper and lower respiratory tract. As nasopharyngeal colonization by pneumococcus is a critical event in the pathogenesis process as it is a prerequisite for developing IPD, the use of certain antibiotics to reduce or even eliminate nasopharyngeal carriage has been proposed, although the long-term use of this prophylactic strategy might contribute to an increased carriage of non-susceptible pneumococcal isolates. One of the major advantages of using phage lysins resides in the high degree of specificity of these compounds, the effectivity against MDR pathogens, their low toxicity, and the low probability of resistance development. Our study shows that Cpl-1 and Cpl-711, the latter in a higher extent, are promising enzybiotics to reduce the nasopharyngeal carriage caused by antibiotic-susceptible and non-susceptible pneumococci. Clearance of the pneumococcal carrier state might be beneficial for certain groups at risk of

suffering recurrent IPD episodes. The results of the present study show that local administration of enzybiotics successfully kills the bacteria attached to nasopharyngeal cells being effective in the reduction of colonization, which might be very important from a prophylactic perspective. In terms of chronic respiratory infections, patients with COPD are at high risk of developing recurrent IPD. The importance of pneumococcal infection affecting patients with chronic medical conditions resides in the difficulty of clearing persistent pneumococcal strains from their lower respiratory tract. In this sense, it would be reasonable that, in a future work and following an approach similar to that of conventional inhalers for human use, administration of Cpl-1 or Cpl-711 by the intranasal route could effectively decrease the attachment of *S. pneumoniae* to human lung epithelial cells. This hypothetical therapeutic approach might be useful for the outcome of the infection in patients suffering recurrent pneumonia episodes associated to COPD or other chronic respiratory conditions in which *S. pneumoniae* is one of the major etiologic agents. Overall, our study suggests the potential benefit of Cpl-1 and Cpl-711 as antimicrobial agents against pneumococcal infections affecting the respiratory tract. This is in agreement with previous observations showing that phage therapy may be an attractive strategy to fight pulmonary infections. As Cpl-1 and Cpl-711 were the most effective bactericidal lytic enzymes against pneumococcal infections associated to cell surfaces, they might be promising candidates against airway colonization caused by clinical isolates of *S. pneumoniae*. This antimicrobial alternative may also be useful to reduce the spread of MDR strains and avoid the transmission between children who are the main carrier of *S. pneumoniae*. Furthermore, the use of these enzymes might be important to abolish persistent and recurrent pneumococcal respiratory infections affecting patients with chronic underlying diseases. Finally, combination of a non-protective dose of Cpl-711 and cefotaxime was administered against pneumococcal sepsis caused by a MDR strain. Our results confirmed that the efficacy of this combination was higher in comparison to the individual treatments, increasing the clearance of *S. pneumoniae* from the bloodstream and the survival rates.

Conclusions: In this Thesis is shown that immunization with LytB is immunogenic and enhances complement-mediated immunity and phagocytosis of different serotypes of *S. pneumoniae*. In addition, antibodies against LytB increase bacterial chain length affecting the bacterial morphology and the recognition by the host immune response. As a consequence, vaccination using LytB increases bacterial clearance and induces protection against pneumococcal sepsis and invasive pneumonia.

The results of the present Thesis also show that local administration of enzybiotics is a promising therapeutic strategy to kill the bacteria attached to human epithelial cells being effective in the reduction of colonization, which might be very important from a prophylactic perspective. Furthermore, combination of sub-therapeutic doses of the lytic enzyme Cpl-711 and cefotaxime was very effective against pneumococcal sepsis caused by a MDR strain, and showed a synergistic effect clearing the bacteria from the systemic circulation.

REFERENCES

- Aguinagalde, L., Corsini, B., Domenech, A., Domenech, M., Cámara, J., Ardanuy, C., García, E., Liñares, J., Fenoll, A., and Yuste, J. (2015). Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain^{9V}-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PloS one* *10*, e0137565.
- Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., Qi, L., Zhang, J.-R., Chen, Y., *et al.* (2014). Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem* *289*, 23403-23416.
- Bogaert, D., de Groot, R., and Hermans, P.W.M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* *4*, 144-154.
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., and Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog* *3*, e168.

- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-b-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* *184*, 4988-5000.
- Díez-Martínez, R., De Paz, H.D., García-Fernández, E., Bustamante, N., Euler, C.W., Fischetti, V.A., Menendez, M., and García, P. (2015). A novel chimeric phage lysin with high *in vitro* and *in vivo* bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* *70*, 1763-1773.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Calatayud, L., Santos, S., Tubau, F., Grau, I., Verdaguer, R., Dorca, J., Pallares, R.n., Martin, R., *et al.* (2011). Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Antimicrob Chemother* *66*, 487-493.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R., and García, J.L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* *31*, 1275-1277.
- Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C.A., Ho, T., Giannoulatou, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., *et al.* (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet* *44*, 352-355.
- Grandgirard, D., Loeffler, J.M., Fischetti, V.A., and Leib, S.L. (2008). Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* *197*, 1519-1522.
- Hermoso, J.A., García, J.L., and García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* *10*, 461-472.
- Jado, I., López, R., García, E., Fenoll, A., Casal, J., and García, P. (2003). Phage lytic enzymes as therapy of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* *52*, 967-973.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* *6*, 288-301.
- Koedel, U., Scheld, W.M., and Pfister, H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* *2*, 721-736.
- Moscoso, M., García, E., and López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* *188*, 7785-7795.
- O'Brien, K.L., and Levine, O.S. (2006). Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine. *Lancet* *368*, 1469-1470.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., *et al.* (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* *374*, 893-902.
- Park, I.H., Geno, K.A., Yu, J., Oliver, M.B., Kim, K.H., and Nahm, M.H. (2015). Genetic, biochemical, and serological characterization of a new pneumococcal serotype, 6H, and generation of a pneumococcal strain producing three different capsular repeat units. *Clinical and vaccine immunology : CVI* *22*, 313-318.
- Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A., and Huang, D.B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol* *62*, 1506-1516.
- Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M., Larruskain, J., Alonso, M., and Ercibengoa, M. (2011). Antimicrobial susceptibilities and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from elderly patients with pneumonia and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *55*, 2729-2734.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E., and 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.

- Sethi, S., and Murphy, T.F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359, 2355-2365.
- van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374, 1543-1556.
- Witzenrath, M., Schmeck, B., Doehn, J.M., Tschernig, T., Zahlten, J., Loeffler, J.M., Zemlin, M., Müller, H., Gutbier, B., Schütte, H., *et al.* (2009). Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37, 642-649.
- Wizemann, T.M., Heinrichs, J.H., Adamou, J.E., Erwin, A.L., Kunsch, C., Choi, G.H., Barash, S.C., Rosen, C.A., Masure, H.R., Tuomanen, E., *et al.* (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69, 1593-1598.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Streptococcus pneumoniae* es uno de los principales agentes etiológicos causantes de neumonía adquirida en la comunidad y enfermedades más severas, como sepsis y meningitis bacteriana, que afectan principalmente a la población infantil y a los mayores de 65 años (Koedel *et al.*, 2002; van der Poll y Opal, 2009). Se estima que más del 25% de los 57 millones de muertes anuales en todo el mundo, están directamente relacionadas con las enfermedades infecciosas. En concreto, las infecciones respiratorias son responsables de la muerte de 4 millones de personas cada año. Según la organización mundial de la Salud (OMS) la prevalencia de sepsis o neumonía en neonatos, así como de neumonía en niños algo mayores representan el 29% de las 10.6 millones de muertes anuales registradas en niños menores de 5 años (10% y 19%, respectivamente), siendo *Streptococcus pneumoniae* la causa más común de neumonía severa en niños y adultos en Europa y Estados Unidos (O'Brien *et al.*, 2009). En general, la tasa de infecciones neumocócicas es mayor que la causada por cualquier otra bacteria patogénica. Como consecuencia, la OMS y las organizaciones como *Wellcome Trust* y *Bill & Melinda Gates Foundation* consideran las enfermedades neumocócicas como un problema mundial. La prevención de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) es una de las prioridades en salud pública debido a las altas tasas mundiales de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños en países en vías de desarrollo (O'Brien *et al.*, 2009). La inmunización es una propuesta segura y altamente eficiente para prevenir ENI. La activación de las cascadas del complemento por anticuerpos específicos conduce a la formación del componente clave C3b, el cual juega un papel crucial en la defensa del hospedador frente a neumococo, recubriendo los microorganismos y estimulando la fagocitosis. Actualmente, con el fin de obtener protección frente a los niños, las medidas profilácticas frente a la infección neumocócica están basadas en vacunas que contienen polisacáridos capsulares que pueden estar conjugadas con proteínas transportadoras (O'Brien y Levine, 2006). Sin embargo, una de las mayores desventajas de estas vacunas polisacáridica se debe a la amplia variabilidad neumocócica, con hasta 96 diferentes polisacáridos capsulares (CPS) descritos hasta la fecha (Park *et al.*, 2015). Una limitación adicional es el intercambio capsular que se ha observado tras la introducción de las vacunas neumocócicas conjugadas (PCVs), lo cual resulta preocupante dado que estas cepas pueden emerger evitando la inmunidad inducida por la vacunación debido a la adquisición de genes capsulares de serotipos no vacunales (Aguinagalde *et al.*, 2015; Brueggemann *et al.*, 2007; Golubchik *et al.*, 2012). Para evitar estos problemas, los esfuerzos en investigación se centran en nuevas proteínas de *S. pneumoniae* candidatas a vacunas, que puede proteger frente a los diferentes serotipos existentes. Uno de los objetivos principales de esta Tesis ha sido caracterizar la hidrolasa de la pared celular LytB de *S. pneumoniae* como potencial candidata a vacuna. LytB se localiza en sitios cercanos a los extremos polares y está expuesta a la superficie. Esta enzima tiene actividad *N*-acetilglucosaminidasa y desempeña un papel esencial en la separación de células hijas (De las Rivas *et al.*, 2002; García *et al.*, 1999).

En términos de patogénesis, LytB participa en la formación de biofilm, unión de células epiteliales humanas y contribuye a la sepsis y neumonía, incrementando la capacidad de LytC para evitar la inmunidad mediada por el complemento y fagocitosis (Bai *et al.*, 2014; Moscoso *et al.*, 2006; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Desde la perspectiva profiláctica, LytB puede ser una diana prometedora para desarrollar una vacuna universal antineumocócica dado que el antisuero anti-LytB protege significativamente a ratones tras ser infectados con dosis letales de diferentes serotipos de neumococo (Wizemann *et al.*, 2001)

A pesar de un tratamiento antibiótico adecuado, la ENI se asocia con altas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Una amenaza importante para luchar contra la ENI es la aparición de cepas con altos niveles de resistencia frente a diferentes antibióticos. En los casos en que el patógeno muestra resistencia a múltiples fármacos, las concentraciones antimicrobianas en el suero pueden ser insuficientes y, por lo tanto, el resultado de la infección dependerá en gran medida de la interacción entre los factores de virulencia bacteriana y los mecanismos inmunes del hospedador.

El transporte asintomático es el prerrequisito de todas estas infecciones y es más frecuentemente asociado a la primera infancia (Bogaert *et al.*, 2004). La colonización exitosa del tracto respiratorio superior es fundamental para la transmisión horizontal y puede conducir a la progresión del proceso de infección, siendo la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) la manifestación clínica más grave (Bogaert *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2009). Además, la colonización microbiana del tracto respiratorio inferior está asociada con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en la que las exacerbaciones y la inflamación de las vías respiratorias son aspectos importantes relacionados con las infecciones neumocócicas persistentes que sufren estos pacientes (Park *et al.*, 2015). El tratamiento antimicrobiano con lisinas purificadas codificadas por fagos (también conocidas como enzibióticos) es una alternativa a los antibióticos actuales para eliminar las infecciones bacterianas a medida que las lisinas matan a las bacterias susceptibles rompiendo enlaces específicos del peptidoglicano y produciendo, así, la lisis osmótica (Hermoso *et al.*, 2007; Pastagia *et al.*, 2013). Este tipo de terapia ha demostrado ser eficaz frente a una amplia variedad de infecciones neumocócicas y tiene la ventaja de una especificidad determinada para su objetivo bacteriano (Grandgirard *et al.*, 2008; Pastagia *et al.*, 2013; Witzentrath *et al.*, 2009).

En esta Tesis Doctoral hemos investigado la habilidad de 3 lisinas denominadas Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 (Díez-Martínez *et al.*, 2015) para reducir la colonización por *S. pneumoniae* usando células epiteliales humanas y modelos murinos de colonización nasofaríngea. El uso terapéutico de los enzibióticos frente a infecciones bacterianas crónicas que afectan el tracto respiratorio está relativamente inexplorado. La carga nasofaríngea por *S. pneumoniae* es esencial para el proceso de patogénesis por ser un prerrequisito en la ENI (Kadioglu *et al.*, 2008). Las estrategias basadas en la eliminación de *S. pneumoniae* desde la nasofaringe, especialmente en niños, son una alternativa prometedora ya que puedes prevenir la progresión de la infección (Bogaert *et al.*, 2004). En pacientes con EPOC, *S. pneumoniae* es uno de los patógenos más frecuentes causantes de los procesos de exacerbaciones agudas y episodios recurrentes de neumonía (Sethi y Murphy, 2008). Desde una perspectiva clínica esta situación es incluso peor, dado que los aislados persistentes de neumococos en los pacientes con EPOC son frecuentemente resistentes a los antibióticos empleados, lo cual puede comprometer el resultado de la infección (Domenech *et al.*, 2011; Pérez-Trallero *et al.*, 2011). El hecho que las lisinas fágicas sean capaces de destruir muy rápido a las bacterias, tan solo con el contacto, hace que el uso de estas enzimas líticas pueda reducir la unión de neumococo a las células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior. Este enfoque antimicrobiano puede ser una estrategia de interés para disminuir la progresión e incluso eliminar bacterias persistentes en infecciones respiratorias crónicas.

PRINCIPALES CONCLUSIONES: En este estudio hemos caracterizado las respuestas inmunológicas y el efecto protector de la hidrolasa de la pared celular LytB como una prometedora vacuna antineumocócica. LytB, a pesar de mostrar cierto polimorfismo en el número repeticiones de los dominios de unión a colina, es una proteína bien conservada entre los aislados clínicos de *S. pneumoniae*. El análisis genético de la glucosaminidasa LytB de los dos aislamientos clínicos empleados en este estudio, se compararon a las secuencias de LytBD39 y LytBTIGR4. Nuestros resultados muestran que la LytB del aislado clínico perteneciente al serotipo 3 carece de dos repeticiones de unión a la colina en comparación a la LytB de las cepas 48 (serotipo 23F) y D39 (serotipo 2). Sin embargo, la LytB de las cepas 48 y D39 son muy similares. La inmunización se realizó utilizando Alhydrogel[®] como adyuvante o LytB mezclado con Alhydrogel[®] ya que este adyuvante ha sido aprobado para uso humano en estudios que evalúan las proteínas neumocócicas. La vacunación con LytB indujo una respuesta IgG de diferentes subclases incluyendo IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 así como IgA. Esto es importante porque algunos de estos subtipos de IgG son obtenidos por las actuales vacunas humanas tales como la vacuna de polisacáridica neumocócica 23-valente (PPSV) y las PCVs. En este sentido, la respuesta de anticuerpos conferida por PPSV es predominantemente de la subclase de IgG2. La magnitud de la respuesta IgG específica de serotipo frente a PCVs varía según el serotipo, la formulación de la vacuna y la edad. En adultos, PCV induce principalmente una respuesta de IgG2 mientras que en los niños la respuesta predominante es de la subclase IgG1. La subclase específica de IgG generada es

relevante desde la perspectiva funcional ya que los anticuerpos IgG1 e IgG3 fijan el complemento y enlazan los receptores Fc γ más eficientemente que IgG2. La inmunización con LytB indujo altos niveles de estas inmunoglobulinas sugiriendo que los anticuerpos a esta proteína podrían activar la fagocitosis mediada por el complemento. En este sentido, se han descrito previamente diferencias en la expresión de isotipos de Ig entre humanos y ratones y la correlación directa entre subtipos dentro de clases en estas especies es difícil de hacer porque no son directamente equivalentes. Sin embargo, a pesar de la dificultad de comparar los hallazgos derivados de estudios de respuestas de Ig murina a humanos, estos estudios pueden ser útiles en la caracterización de nuevos antígenos proteicos para el desarrollo de vacunas aumentando la comprensión de mecanismos inmunes protectores contra la infección neumocócica.

Los experimentos basados en el estudio de la activación del complemento en la superficie de dos aislados clínicos diferentes demostraron que los anticuerpos frente a LytB aumentan el reconocimiento por C1q y C3b, demostrando que la vacunación con LytB desencadena la activación de la vía clásica del complemento. Esto es crítico en términos de infección neumocócica ya que esta vía ha demostrado ser vital para la activación del complemento por *S. pneumoniae* en humanos y ratones. La defensa del huésped contra neumococo depende de la opsonofagocitosis con neutrófilos, ya que son esenciales en la respuesta inmune y la neutropenia está altamente asociada a una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica. En este estudio, usando una línea celular diferenciada en neutrófilos, mostramos que la inmunización con LytB aumentó la fagocitosis mediada por el complemento, confirmando que los anticuerpos anti-LytB activan el proceso de fagocitosis frente a *S. pneumoniae*. La generación de una respuesta de IgG3 por inmunización con LytB puede ser relevante frente a la infección sistémica, ya que esta inmunoglobulina es altamente protectora frente a una infección neumocócica. Una explicación adicional podría deberse a los cambios morfológicos que inducen los anticuerpos en las bacterias. Esto es importante porque LytB es esencial para la separación celular al final de la división celular, ya que las cepas neumocócicas que carecen de LytB forman cadenas largas en lugar de la morfología típica de diplococos. Nuestros resultados muestran que los anticuerpos frente a LytB aumentan el tamaño bacteriano induciendo el encadenamiento, que es compatible con la susceptibilidad aumentada a la fagocitosis mediada por el complemento.

El papel protector de LytB se exploró en modelos murinos de sepsis y neumonía. La vacunación con LytB protegió frente a la sepsis y neumonía invasiva causada por aislados clínicos de los serotipos 3 o 23F. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos frente a LytB controló la replicación bacteriana en el torrente sanguíneo reduciendo la gravedad del proceso de infección en ambos serotipos. Esto es relevante desde el punto de vista profiláctico frente a cepas del serotipo 3 ya que los casos de ENI debidos a este serotipo no han disminuido después de la introducción de las PCV actuales. Además, la falta de eficacia clínica frente a aislados de serotipo 3 después de la administración de PCV se ha asociado a una respuesta inmune alterada y a la abundancia de polisacárido capsular producido por estas cepas. Además, el fracaso relativo de la protección inducida por la PCV-13 actual, frente a aislados de serotipo 3, ha sido recientemente relacionado con la liberación de CPS de tipo 3 por estos aislados, que interfieren con la muerte mediada por anticuerpos y la protección por anticuerpos anti-CPS. En este sentido, nuestro estudio muestra que la inmunización con LytB incrementa la fagocitosis mediada por el complemento, así como la eliminación bacteriana en el sistema circulatorio, protegiendo frente a la sepsis neumocócica y la neumonía causada por una cepa del serotipo 3. Los resultados de esta Tesis sugieren que LytB es una prometedora candidata a vacuna que podría ser empleada sola o bien en un cóctel de manera combinada con otros antígenos, ya que las combinaciones de proteínas neumocócicas pueden proporcionar efectos aditivos o sinérgicos que pueden ser beneficiosos. Alternativamente, el uso de LytB como proteína portadora de CPS de tipo 3 podría ser una estrategia profiláctica para aumentar la inmunogenicidad frente a este serotipo. En general, nuestro estudio confirma el beneficio potencial de LytB como antígeno de proteína para vacunas contra la neumonía neumocócica y la enfermedad invasiva.

El uso de enzimas líticas codificadas por bacteriófagos, es una estrategia terapéutica alternativa para la prevención y el control de enfermedades causadas por bacterias Gram-positivas incluyendo *S. pneumoniae*. En el presente estudio, se ha investigado la actividad antimicrobiana de tres enzibióticos frente a cepas de neumococos resistentes a múltiples fármacos (MDR) que colonizan el tracto respiratorio superior e inferior. Como la colonización de la nasofaringe por neumococo es un punto crítico en el proceso de patogénesis, por ser un requisito previo para el desarrollo de la ENI, se ha propuesto el uso de ciertos antibióticos para reducir o incluso eliminar el transporte en la nasofaringe, aunque el uso a largo plazo de esta estrategia profiláctica podría contribuir a un aumento del transporte de cepas neumocócicas no susceptibles. Una de las principales ventajas del uso de lisinas de fago reside en el alto grado de especificidad de estos compuestos, la efectividad frente a patógenos MDR, su baja toxicidad y la baja probabilidad de desarrollo de resistencia. Nuestro estudio muestra que los enzibióticos Cpl-1 y Cpl-711, este último en mayor medida, son prometedores para reducir el transporte en la nasofaringe causado por neumococos sensibles o no a antibióticos. La eliminación del estado portador de neumococo puede ser beneficiosa para ciertos grupos que corren el riesgo de padecer episodios recurrentes de ENI. Los resultados del presente estudio muestran que la administración local de enzibióticos mata con éxito las bacterias unidas a las células nasofaríngeas, y por tanto, son eficaces en la reducción de la colonización, lo que podría ser muy importante desde una perspectiva profiláctica.

En cuanto a las infecciones respiratorias crónicas, los pacientes con EPOC tienen un alto riesgo de desarrollar ENI recurrente. La importancia de la infección neumocócica, cuando afecta a pacientes con afecciones médicas crónicas, reside en la dificultad de eliminar las cepas persistentes de las vías respiratorias inferiores. En este sentido, sería razonable que en un trabajo futuro y siguiendo un enfoque similar al de los inhaladores convencionales para uso humano, la administración de Cpl-1 o Cpl-711 por la vía intranasal pudiera disminuir eficazmente la unión de *S. pneumoniae* a células epiteliales pulmonares humanas. Este hipotético enfoque terapéutico podría ser útil para el resultado de la infección en pacientes que sufren episodios de neumonía recurrente asociados a EPOC u otras afecciones respiratorias crónicas en las que *S. pneumoniae* es uno de los principales agentes etiológicos. En general, nuestro estudio muestra el beneficio potencial de Cpl-1 y Cpl-711 como agentes antimicrobianos frente a las infecciones neumocócicas que afectan a las vías respiratorias. Esto concuerda con observaciones previas que demuestran cómo la terapia con fagos puede ser una estrategia atractiva para combatir las infecciones pulmonares. Como Cpl-1 y Cpl-711 fueron las enzimas líticas bactericidas más eficaces frente a las infecciones neumocócicas asociadas a las superficies celulares, podrían ser candidatos para evitar la colonización de las vías aéreas causada por aislados clínicos de *S. pneumoniae*. Esta alternativa antimicrobiana también puede ser útil para reducir la propagación de cepas con MDR antibiótica y evitar la transmisión entre niños, que son el principal portador de *S. pneumoniae*. Además, el uso de estas enzimas podría ser importante para eliminar las infecciones respiratorias neumocócicas persistentes y recurrentes que afectan a pacientes con enfermedades crónicas subyacentes. Finalmente, se administró la combinación de una dosis no protectora de Cpl-711 y cefotaxima frente a la sepsis neumocócica causada por una cepa MDR. Nuestros resultados confirmaron que la eficacia de esta combinación es mayor en comparación a los tratamientos individuales, aumentando la eliminación de *S. pneumoniae* del torrente sanguíneo e incrementando la tasa de supervivencia.

CONCLUSIONES: En esta Tesis se muestra que la inmunización con LytB es inmunogénica y potencia la inmunidad mediada por el complemento y la fagocitosis de diferentes serotipos de *S. pneumoniae*. Además, los anticuerpos frente a LytB aumentan la longitud bacteriana afectando no sólo a la morfología sino también al reconocimiento por el sistema inmune del hospedador. Como consecuencia, la vacunación con LytB incrementa el aclaramiento bacteriano e induce protección frente a la sepsis neumocócica y la neumonía invasiva.

Los resultados de la presente Tesis, también demuestran que la administración local de enzibióticos es una estrategia terapéutica prometedora para eliminar las bacterias unidas a células epiteliales humanas, reduciendo la colonización, lo que podría ser muy importante desde una perspectiva profiláctica. Además, la combinación de dosis sub-terapéuticas de la enzima lítica Cpl-711 y cefotaxima fue muy eficaz frente a la sepsis neumocócica causada por una cepa MDR y mostró un efecto sinérgico eliminando las bacterias del sistema circulatorio.

REFERENCIAS

- Aguinagalde, L., Corsini, B., Domenech, A., Domenech, M., Cámara, J., Ardanuy, C., García, E., Liñares, J., Fenoll, A., and Yuste, J. (2015). Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain^{9V}-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PloS one* *10*, e0137565.
- Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., Qi, L., Zhang, J.-R., Chen, Y., *et al.* (2014). Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem* *289*, 23403-23416.
- Bogaert, D., de Groot, R., and Hermans, P.W.M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* *4*, 144-154.
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., and Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog* *3*, e168.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-b-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* *184*, 4988-5000.
- Diez-Martínez, R., De Paz, H.D., García-Fernández, E., Bustamante, N., Euler, C.W., Fischetti, V.A., Menendez, M., and García, P. (2015). A novel chimeric phage lysin with high *in vitro* and *in vivo* bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* *70*, 1763-1773.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Calatayud, L., Santos, S., Tubau, F., Grau, I., Verdaguer, R., Dorca, J., Pallares, R.n., Martin, R., *et al.* (2011). Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Antimicrob Chemother* *66*, 487-493.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R., and García, J.L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* *31*, 1275-1277.
- Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C.A., Ho, T., Giannoulatou, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., *et al.* (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet* *44*, 352-355.
- Grandgirard, D., Loeffler, J.M., Fischetti, V.A., and Leib, S.L. (2008). Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* *197*, 1519-1522.
- Hermoso, J.A., García, J.L., and García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* *10*, 461-472.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* *6*, 288-301.
- Koedel, U., Scheld, W.M., and Pfister, H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* *2*, 721-736.
- Moscoso, M., García, E., and López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* *188*, 7785-7795.
- O'Brien, K.L., and Levine, O.S. (2006). Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine. *Lancet* *368*, 1469-1470.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., *et al.* (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* *374*, 893-902.

- Park, I.H., Geno, K.A., Yu, J., Oliver, M.B., Kim, K.H., and Nahm, M.H. (2015). Genetic, biochemical, and serological characterization of a new pneumococcal serotype, 6H, and generation of a pneumococcal strain producing three different capsular repeat units. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 22, 313-318.
- Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A., and Huang, D.B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol* 62, 1506-1516.
- Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M., Larruskain, J., Alonso, M., and Ercibengoa, M. (2011). Antimicrobial susceptibilities and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from elderly patients with pneumonia and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, 2729-2734.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E., and 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.
- Sethi, S., and Murphy, T.F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359, 2355-2365.
- van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374, 1543-1556.
- Witzenrath, M., Schmeck, B., Doehn, J.M., Tschernig, T., Zahlten, J., Loeffler, J.M., Zemlin, M., Müller, H., Gutbier, B., Schütte, H., *et al.* (2009). Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37, 642-649.

I. INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA NATURAL DE *S. pneumoniae*

1.1. Aspectos históricos

Streptococcus pneumoniae (comúnmente conocido como neumococo) fue descubierto, de forma independiente y casi simultánea, en los años 80 del siglo XIX por Sternberg y Pasteur. George M. Sternberg aisló el microorganismo de la sangre de conejos inoculados con su propia saliva (Sternberg, 1881) mientras que Louis Pasteur, aisló la bacteria de ratones a los que había inyectado la saliva de un niño muerto por el virus de la rabia (Pasteur, 1881). Las observaciones de Pasteur se hicieron públicas antes que las de Sternberg en una reunión de la Academia Francesa de Medicina celebrada en París en enero de 1881. Neumococo, desde entonces, ha tenido numerosas denominaciones; fue inicialmente nombrado *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884) y, años más tarde, *Diplococcus pneumoniae* (Weichselbaum, 1886) y, finalmente, *S. pneumoniae* (Chester, 1901), debido a dos particularidades, la capacidad de formar cadenas y a su asociación con neumonía. No obstante, debe hacerse notar que esta nomenclatura no fue aceptada oficialmente hasta 1980 (Skerman *et al.*, 1980). Este patógeno resultó ser una bacteria Gram-positiva. De hecho, en 1884, el bacteriólogo danés Christian Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre no tanto para diferenciar bacterias sino para facilitar la visualización de neumococo en el tejido pulmonar (Gram, 1884).

Neumococo ha desempeñado un gran papel en el desarrollo de la biología molecular. En 1928, el médico inglés Frederick Griffith obtuvo, a partir de sus estudios sobre la cápsula del microorganismo, la primera evidencia de transformación genética bacteriana al observar que si se inyectaban en un ratón neumococos capsulados (muertos por calor) junto a cepas no capsuladas vivas (que carecían de virulencia por sí solas), se producía una enfermedad mortal y los microorganismos que se recuperaban del animal eran de tipo capsulado (Griffith, 1928). Años más tarde se pudo demostrar que el DNA (y no las proteínas, como se creía entonces) constituye la unidad básica del material genético (Avery *et al.*, 1944; McCarty y Avery, 1946).

Durante la segunda mitad del siglo XX se hicieron otros hallazgos notables con este patógeno, entre los que cabe destacar el conocimiento de las bases biológicas de la capacidad de incorporar en su genoma fragmentos de DNA monocatenario, un proceso que se denominó “competencia”. Muchos científicos, entre los que se encuentran S. Lacks, D. Morrison y J-P. Claverys, estudiaron la naturaleza y mecanismos por los que se produce la competencia y la transformación genética, descubriendo que estos procesos son la base de fenómenos relevantes como la resistencia a los antimicrobianos (Claverys *et al.*, 2000; Håvarstein y Morrison, 1999; Lacks, 1977).

1.2. Características generales

Neumococo es una bacteria Gram-positiva, de 0.5–1.25 μm de longitud que, frecuentemente, forma parte de la microbiota del tracto respiratorio superior del ser humano, pudiendo este patógeno colonizar la nasofaringe durante los primeros días de vida, denominándose en aquel momento, como “estado de portador”. Es una bacteria inmóvil, que no forma endosporas y es un miembro α -hemolítico del género *Streptococcus*. La α -hemólisis que se produce alrededor de las colonias de neumococo cuando se cultiva en placas de agar-sangre en aerobiosis es debida a la formación de metahemoglobina (Butterfield y Peabody,

1913; Cole, 1914), producida por el peróxido de hidrogeno (Barnard y Stinson, 1996). Sin embargo, si se incuba en anaerobiosis, se observa β -hemólisis debido la acción de la neumolisina (Ply) (Johnson *et al.*, 1982).

S. pneumoniae se encuentra, habitualmente, formando cadenas cortas o en parejas (formando diplococos). Es un microorganismo microaerófilo, catalasa negativo y pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas, puesto que el compuesto principal que produce tras la fermentación de carbohidratos es, precisamente, el ácido láctico. Las células de neumococo se lisan completamente en presencia de sales biliares como el desoxicolato sódico (Doc) (Neufeld, 1902); este detergente dispara la actividad de LytA (una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa; o NAM-amidasa; EC 3.5.1.28), que es la principal autolisina de este microorganismo. La degradación de la pared celular es un proceso totalmente dependiente del aminoalcohol colina (García *et al.*, 1985; Höltje y Tomasz, 1975; Mosser y Tomasz, 1970; Tomasz, 1967). La colina es absolutamente imprescindible para el crecimiento de este microorganismo (Tomasz, 1967) y es un elemento estructural de los ácidos teicoicos (TAs) de la pared celular y de los lipoteicoicos (LTAs) unidos a la membrana (Brundish y Baddiley, 1968; Fischer, 2000; Fischer *et al.*, 1993). Además de la lisis en presencia de Doc, la sensibilidad a la optoquina (Opt) es otra prueba diagnóstica universalmente utilizada para la identificación de aislados de neumococo en el laboratorio clínico (Lund y Henrichsen, 1978). La Opt, un derivado de la quinina, es un inhibidor específico de algunas de las proteínas que forman parte de la subunidad F_0 de la ATPasa protón-motriz (H^+ -ATPasa) de neumococo (Balsalobre *et al.*, 2006; Fenoll, 1994). Además, hay que tener en cuenta que existen cepas de neumococo Opt-resistentes (Opt^R) así como estreptococos filogenéticamente muy próximos a neumococo —los denominados estreptococos del grupo mitis o SGM— que pueden ser susceptibles a la acción de la Opt (Opt^S) (Balsalobre *et al.*, 2006; de la Campa *et al.*, 1997; Martín-Galiano *et al.*, 2003). En consecuencia, esta técnica debe ser utilizada conjuntamente con la de la lisis en presencia de Doc para poder llevar a cabo un diagnóstico correcto.

La cápsula de neumococo, la estructura más externa, está formada por polisacáridos complejos que, a su vez, están compuestos por unidades repetidas de azúcares (Kamerling, 2000). En la mayoría de los casos estos polisacáridos se encuentran unidos al peptidoglicano, posiblemente mediante enlaces covalentes (Sørensen y Blom, 1992), o a componentes de la membrana, que a veces pueden liberarse de la célula (Eberhardt *et al.*, 2012; Yother, 2011). En la actualidad, se han descrito más de 94 serotipos capsulares inmunológicamente diferentes, 90 de los cuales ya estaban descritos en 1995 (Henrichsen, 1995).

En la actualidad, existen 13 especies de estreptococos del grupo mitis (Martín *et al.*, 2011) pero las más próximas filogenéticamente a neumococo son, por este orden, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus infantis* (Donati *et al.*, 2010; Kilian *et al.*, 2008). Con todo, la prueba que ha ganado una mayor aceptación en la caracterización de neumococo en clínica es la prueba capsular o de "Quellung" (Neufeld, 1902). Esta técnica se utiliza tanto para la serotipificación de cepas, usando sueros monovalentes frente a los, al menos, 96 tipos descritos (Park *et al.*, 2015), como para la identificación de aislados, para lo cual se utiliza un suero polivalente, denominado OMNISERUM, que contiene una mezcla de antisueros frente a todos esos tipos.

1.3. Importancia epidemiológica y clínica

S. pneumoniae es un microorganismo patógeno casi exclusivamente humano, aunque se han aislado neumococos a partir de animales de compañía o de otros que habían estado previamente en contacto con seres humanos, especialmente niños (Denapaite y Hakenbeck, 2011; van der Linden *et al.*, 2009). Es interesante resaltar que algunas cepas de *S. pneumoniae* de serotipo 3 son causa frecuente de enfermedad respiratoria en caballos de carreras (Benson y Sweeney, 1984; Chanter, 1994; Wood *et al.*, 2005). Sin embargo, aparte del ser humano, neumococo parece ser también causa de enfermedad respiratoria potencialmente letal en chimpancés salvajes (Chi *et al.*, 2007).

Como ya se ha mencionado, el hábitat natural de neumococo es el tracto respiratorio superior humano y, de modo asintomático, la nasofaringe de un elevado porcentaje de niños (20–40%) y, de manera menos frecuente, de adultos (5–10%) y la colonización comienza poco después del nacimiento (estado de portador) (Austrian, 1986; Bogaert *et al.*, 2004). Se ha estimado que en la población de entre 1 y 59 meses de edad, se producen casi 15 millones de casos de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) (93% de neumonías) que ocasionan entre 700.000 y 1 millón de fallecimientos anualmente en todo el mundo (O'Brien *et al.*, 2009; WHO, 2007, 2009). Resulta evidente, que existe una clara relación entre la edad y la susceptibilidad a la infección por este patógeno. Esta última es especialmente elevada en ciertos grupos de edad, como en la población pediátrica, entre los que se encuentran neonatos y niños menores de 2 años, debido a que su sistema inmunitario no se encuentra completamente desarrollado. La susceptibilidad disminuye en adolescentes y adultos jóvenes y aumenta de nuevo en adultos mayores de 65 años debido nuevamente, a la decreciente función del sistema inmunológico. La enfermedad neumocócica afecta tanto a individuos sanos (sin enfermedad de base conocida) como a pacientes inmunodeprimidos (Butler, 2004; Parsons y Dockrell, 2002).

Una vez que neumococo coloniza la nasofaringe humana puede diseminarse causando diferentes enfermedades, desde patologías leves tras invadir y colonizar el oído (otitis media) u ojos (conjuntivitis), hasta otras más severas, como son los casos de neumonías invasivas, septicemia y meningitis.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que las enfermedades respiratorias son responsables de la tercera parte de muertes anuales en el mundo, causando el fallecimiento de 4 millones de personas y el agente etiológico predominante en estas infecciones es *S. pneumoniae* (Morens *et al.*, 2004; UNICEF y WHO, 2006). A pesar de que en la actualidad dicha tendencia ha cambiado, en países en vías de desarrollo, las infecciones neumocócicas siguen siendo la principal causa de mortalidad infantil. Según estimaciones de la OMS, de los cerca de 11 millones de muertes anuales que afectan a niños menores de 5 años, neumococo es responsable de casi el 30% de las mismas, siendo el causante más frecuente de neumonía infantil severa, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (UNICEF y WHO, 2006).

Un problema adicional en la infección neumocócica es la aparición de aislados clínicos resistentes a los antibióticos. Si bien, en los años 40 del siglo XX ya se habían descrito mutantes de neumococo resistentes a penicilina (Pen^R) obtenidos tanto *in vitro* (Eriksen, 1945; Rake *et al.*, 1944) como en animales de experimentación (Schmidt y Sesler, 1943), no fue hasta la década de los 60 cuando se observaron los primeros casos en humanos. Los primeros aislados clínicos de *S. pneumoniae* Pen^R se detectaron en Estados Unidos y Australia en los años 60 (Hansman y Bullen, 1967; Kislak *et al.*, 1965) mientras que los primeros neumococos

multirresistentes y con una alta resistencia a Pen (Concentración Mínima Inhibitoria, MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) fueron descubiertos en Sudáfrica una década después (Jacobs *et al.*, 1978). En España, el primer aislado clínico Pen^R fue identificado en 1979 (Casal, 1982) y, desde entonces, la cifra de cepas resistentes ha ido aumentando progresivamente. En los años 80 del siglo pasado tuvo lugar un aumento gradual en la resistencia de *S. pneumoniae* frente a Pen y otros antibióticos. Los casos de cepas Pen^R pueden ser tratados eficazmente con quinolonas o macrólidos aunque también se han descrito situaciones de resistencia frente a antibióticos de estas familias (Balsalobre *et al.*, 2003; Low, 2005). La vancomicina (Van) es el antibiótico utilizado como último recurso para casos de cepas multirresistentes pero ya se han documentado casos en los que se ha observado tolerancia a este fármaco (Moscoso *et al.*, 2011). Recientemente, se ha llegado a señalar que, debido a los niveles de resistencia frente a los antibióticos que han alcanzado ciertas bacterias Gram-positivas entre las que se incluye *S. pneumoniae*, estas variantes clínicas han alcanzado clínicamente el estatus de “supergermenes” (Hancock, 2005).

1.4. Factores de virulencia

S. pneumoniae tiene diferentes elementos estructurales, considerados como factores de virulencia, que le conceden capacidad patogénica. El principal factor de virulencia de neumococo es la cápsula o polisacárido capsular (CPS) que proporciona protección frente a la respuesta inmune innata del hospedador (Brueggemann *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2015). Como otros organismos patógenos, neumococo sintetiza moléculas que le proporcionan una ventaja selectiva, frecuentemente a expensas del hospedador. Dichos factores confieren al microorganismo la capacidad de colonizar e invadir al hospedador facilitando su adhesión a los tejidos y la capacidad de invasión y permiten la evasión del sistema inmune, impidiendo así la fagocitosis (Tabla 1) (Hyams *et al.*, 2010; Llull *et al.*, 2001; Yother, 2004).

Tabla 1. Principales proteínas de *S. pneumoniae* implicadas en patogénesis.

PROTEÍNA ^a	FUNCIÓN	REFERENCIA
CBPs		
LytA	NAM-amidasa (EC 3.5.1.28). Principal autolisina.	(Gosink <i>et al.</i> , 2000; Ronda <i>et al.</i> , 1987)
LytB	N-acetilglucosaminidasa. Separación de las células al final de la división celular.	(García <i>et al.</i> , 1999b)
LytC	Lisozima (EC 3.2.1.17). Autolisina 30°C.	(García <i>et al.</i> , 1999a; Gosink <i>et al.</i> , 2000)
Pce	Fosforilcolín esterasa. Hidrolasa de pared celular. Se une a plasminógeno.	(Attali <i>et al.</i> , 2008a; Attali <i>et al.</i> , 2008b; Gosink <i>et al.</i> , 2000)
PspA	Proteína A de superficie de neumococo. Se une a lactoferrina humana.	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1999)
PspC	Proteína C de superficie de neumococo. Se une al factor H del sistema del complemento.	(Dave <i>et al.</i> , 2001)
CbpG	Posible serín proteasa	(Gosink <i>et al.</i> , 2000)
LPXTG		
NanA	Neuraminidasa	(Banerjee <i>et al.</i> , 2010; Uchiyama <i>et al.</i> , 2009)
IgA	Zinc metaloproteasa de IgA1	(Weiser <i>et al.</i> , 2003)
LIPOPROTEÍNA		
PsaA	Lipoproteína transportadora de manganeso. Se une a cadherina E.	(Anderton <i>et al.</i> , 2007; Johnston <i>et al.</i> , 2004)
PiuA/PiA	Componentes lipoproteicos de transportadores ABC.	(Jomaa <i>et al.</i> , 2006; Jomaa <i>et al.</i> , 2005)
OTRAS		
HtrA	Serín-proteasa	(Sebert <i>et al.</i> , 2005)
PavA	Proteína A de adhesión y virulencia. Se une a fibronectina.	(Holmes <i>et al.</i> , 2001; Pracht <i>et al.</i> , 2005)
PepO	Endopeptidasa. Se une a plasminógeno y fibronectina.	(Agarwal <i>et al.</i> , 2013)
Eno	Fosfopiruvato hidratasa (α -enolasa) (EC 4.2.1.11). Se une a plasminógeno	(Attali <i>et al.</i> , 2008b)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12). Se une a plasminógeno	(Attali <i>et al.</i> , 2008b)
Ply	Citolisina dependiente de colesterol. Forma poros en las membranas celulares.	(Marriott <i>et al.</i> , 2008)

^a Pce, se denomina también LytD y CbpE; PspC se denomina también CbpA, SpsA y PbcA. LPXTG, proteínas que se unen covalentemente al peptidoglicano mediante la acción de una sortasa.

1.4.1. La cápsula polisacáridica

La capsula polisacáridica o CPS es esencial para el proceso de patogénesis de *S. pneumoniae* ya que permite evadir de forma eficiente el reconocimiento por diferentes

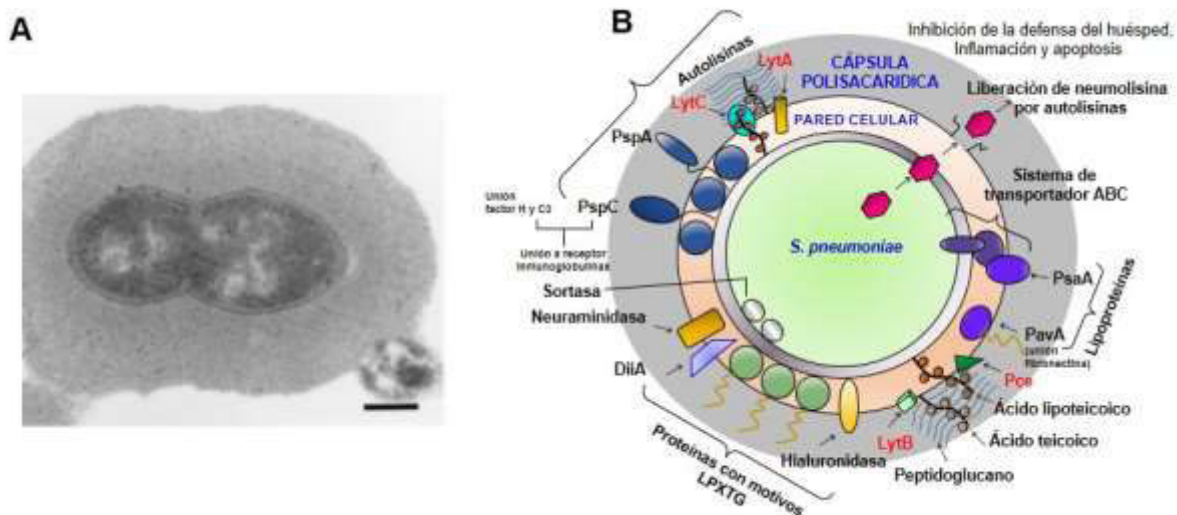


Figura 1. Aspecto de *Streptococcus pneumoniae* y esquema de los diferentes componentes bacterianos (A) Imagen al microscopio electrónico de transmisión de un corte ultrafino de una cepa capsulada de serotipo 3 de neumococo mostrando la cápsula polisacáridica que rodea a la célula (Kim *et al.*, 1999). Barra: 0.3 μ m. (B) Representación esquemática de algunas proteínas y otras moléculas de superficie implicadas en la virulencia de *S. pneumoniae*. Modificada de Mitchell (Mitchell, 2003).

mecanismos de defensa del hospedador (Figura 1) (Griffith, 1928). Aunque las variantes sin CPS son prácticamente avirulentas, se han descrito aislados de neumococo no tipificables (previsiblemente carentes de CPS) que causan frecuentes brotes de conjuntivitis (Patel *et al.*, 2007; Porat *et al.*, 2006), así como casos aislados de conjuntivitis (Haas *et al.*, 2011) u otitis media (Xu *et al.*, 2011) La cápsula de neumococo está formada por polisacáridos complejos (Figura 1) que, a su vez, están compuestos por unidades repetidas de azúcares (Kamerling, 2000). En la mayoría de los casos estos polisacáridos se encuentran unidos al peptidoglicano, posiblemente mediante enlaces covalentes (Sørensen y Blom, 1992), o a componentes de la membrana, que a veces pueden liberarse de la célula (Eberhardt *et al.*, 2012; Yother, 2011).

Actualmente, se han identificado más de 94 serotipos capsulares en base a su inmunogenicidad, 90 de los cuales ya estaban descritos en 1995 y el resto en los últimos años —posiblemente como consecuencia del desarrollo de métodos analíticos más sensibles— (Calix *et al.*, 2012; Henrichsen, 1995). La organización de los serotipos de *S. pneumoniae* se agrupa en primer lugar en serogrupos, debido a los diferentes patrones de aglutinación y a la reacción cruzada con los anticuerpos. Se han descrito un total de 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (los números 26 y 30 no se utilizan). Algunos de ellos incluyen un sólo serotipo (serotipos 1, 2 y 3), mientras que otros serogrupos como el 11 incluyen hasta seis serotipos diferentes (11A, 11B, 11C, 11D, 11E y 11F).

Normalmente, el primer serotipo descrito en un serogrupo con varios serotipos se identifica con la letra F (por *first*) y los siguientes con las letras A, B, etc. Existen, no obstante, tres excepciones: el serogrupo 6, que incluye los serotipos 6A, 6B, 6C y 6D, el 20, con los serotipos 20A y 20B, y el serogrupo 9, en el que las letras de los tres primeros serotipos descritos (Vammen, 1939) tienen relación con personajes históricos L por Lederle, N por Neufeld y V por Valdemar, un príncipe danés muerto en 1938 de una neumonía bacteriémica y del que se aisló el primer neumococo de este serotipo (Henrichsen, 1995).

Los genes involucrados en la producción de la cápsula están localizados en un mismo locus *cap* o *cps* (según diferentes autores) y típicamente codifican una flipasa, una polimerasa y varias transferasas que catalizan la formación de enlaces, adición de azúcares y modificación de unidades repetidas. Una de las características más llamativas del locus *cap* es su enorme divergencia genética, puesto que sólo unos pocos genes se encuentran conservados (Bentley *et al.*, 2006) (López y García, 2004) (Arrecubieta *et al.*, 1996). Es importante destacar que las condiciones ambientales ejercen un papel importante en la cantidad de CPS sintetizado por neumococo (Ogunniyi *et al.*, 2002), lo que podría modificar el grado de exposición de las proteínas de superficie, repercutiendo de este modo en la patogénesis de neumococo (Kim y Weiser, 1998).

1.4.2. La pared celular

La pared celular consiste en una red covalente situada alrededor de la membrana celular, a modo de exoesqueleto, que le aporta flexibilidad y rigidez, protegiendo a la bacteria de su posible lisis, ya sea osmótica o mecánica (Salton, 1994). El componente básico de la pared, muy conservado entre todas las bacterias, es el polímero denominado peptidoglicano que está formado por un entramado tridimensional de cadenas glicánicas constituidas por residuos alternados de ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) y *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) unidos mediante enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ que se entrecruzan mediante cortos segmentos peptídicos (Figura 2) (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). (Denapaite *et al.*, 2012).

Un aspecto de interés en la patogénesis del microorganismo es que la pared celular juega un papel importante en la virulencia bacteriana, aunque de modo indirecto ya que la liberación de fragmentos de la pared celular tras la lisis bacteriana induce un proceso inflamatorio similar al observado después de la infección con neumococos completos. De esta manera, la inyección de la pared celular purificada en ratones imita infecciones como la otitis media, meningitis o bacteriemia (Carlsen *et al.*, 1992; Tuomanen *et al.*, 1985a; Tuomanen *et al.*, 1985b). Además, la pared celular sirve de anclaje de dos grupos de proteínas que juegan un papel crucial en la patogénesis del microorganismo como son las proteínas de unión a colina y el grupo de proteínas de superficie que se unen a la pared a través del motivo LPXTG.

1.4.3. Proteínas de superficie

S. pneumoniae sintetiza una gran variedad de proteínas tanto de superficie como citoplasmáticas que participan en numerosos procesos de interacción con el hospedador y que son esenciales para la patogénesis de la bacteria durante la colonización y los estados de dispersión e invasión, por lo que muchas de ellas son también consideradas factores de virulencia (Figura 1). Debido al importante papel de las proteínas de superficie en la interrelación con el hospedador, a la capacidad inmunogénica de muchas de ellas y a su frecuente presencia en la mayoría de los aislados clínicos de diferentes serotipos, estas proteínas constituyen buenas candidatas como antígenos potencialmente útiles para el diseño de vacunas. Por este motivo, en la presente memoria se describen en más detalle aquellas proteínas que contribuyen de forma crucial a la virulencia del microorganismo y que podrían ser de interés como posibles antígenos vacunales.

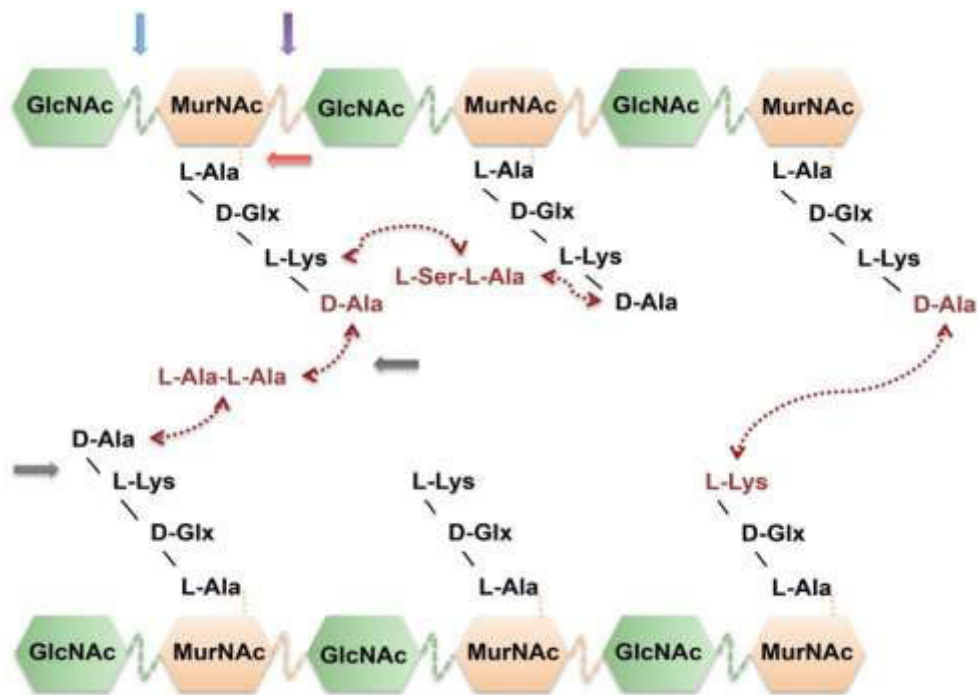


Figura 2. Representación esquemática de los componentes de la pared celular de neumococo. Las cadenas glicánicas están formadas por repeticiones del disacárido N-acetil-glucosamina–N-acetil-murámico (GlcNAc- β (1 \rightarrow 4)-MurNAc) que se entrecruzan a través de segmentos peptídicos (en negro) unidos a los residuos de MurNAc. Las uniones interpeptídicas (en granate) pueden ser directas o mediadas por puentes peptídicos cortos. Las flechas indican los enlaces de la pared hidrolizados por los distintos tipos de mureín-hidrolasas: glucosaminidasas (en azul), muramidasa (en morado), amidasa (en rojo) y endopeptidasa (en gris). Modificada de Weidel y Pelzer (1964).

1.4.3.1. Neumolisina (Ply)

La neumolisina (Ply) pertenece al grupo de proteínas denominadas citolisinas dependientes de colesterol (Hotze y Tweten, 2012), constituye uno de los factores de virulencia clásicos de neumococo y su existencia fue detectada ya en los primeros años del pasado siglo (Cole, 1914; Libman, 1905). Ply es un miembro de la familia de toxinas citolíticas (Dunstone y Tweten, 2012) y está presente en todos los aislados clínicos de este patógeno (Marriott *et al.*, 2008) aunque, recientemente, se ha informado de la existencia de mutantes naturales de *S. pneumoniae* que producen una Ply no hemolítica y son, sin embargo, muy invasivos (Ritchie *et al.*, 2012). Ply tiene múltiples actividades independientes en patogénesis, por ejemplo, activa el complemento (por la vía clásica) reduciendo la disponibilidad de componentes del complemento para el reconocimiento de neumococo (Paton *et al.*, 1984). Esta proteína es capaz también de estimular la apoptosis de las células del hospedador (Braun *et al.*, 2002) y actúa como citolisina mediante la unión al colesterol presente en la membrana de las células eucarióticas, insertándose en las membranas celulares y formando poros de 350–450 Å de diámetro (Tilley *et al.*, 2005). La presencia de Ply ha sido definida como esencial en el establecimiento de la ENI en diferentes modelos de neumonía neumocócica invasiva (Kadioglu *et al.*, 2002; Maus *et al.*, 2004; Rubins *et al.*, 1995; Witzenrath *et al.*, 2006), sepsis (Yuste *et al.*, 2005) y meningitis (Hirst *et al.*, 2008; Hupp *et al.*, 2012; Wellmer *et al.*, 2002), Ply fue la primera proteína de

neumococo que se describió como antígeno vacunal (Paton *et al.*, 1983) aunque este aspecto se detallará más adelante.

1.4.3.2. Proteína A de superficie neumocócica (PspA)

PspA es una proteína de unión a colina localizada en la superficie bacteriana que está presente en todos los aislados descritos de *S. pneumoniae*, y que fue sugerida como uno de los primeros antígenos vacunales frente a neumococo (McDaniel *et al.*, 1986). La principal función de PspA en patogénesis consiste en la inhibición de la activación de la vía alternativa del complemento al interaccionar con el factor B de esta cascada, evitando la inmunidad innata del complemento y protegiendo de este modo, a los neumococos de la fagocitosis mediada por el sistema inmune (Darrieux *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 1999). Además, es capaz de reclutar la proteína sérica apolactoferrina, que es un importante componente de la respuesta inmune innata, de modo que esta unión previene a los neumococos de la acción bactericida de esta proteína (Shaper *et al.*, 2004).

1.4.3.3. Proteína C de superficie neumocócica (PspC)

PspC es una proteína de unión a colina de naturaleza polimórfica, anotada de forma diferente por varios grupos, quizás debido a su estructura alélica (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Dave *et al.*, 2001). En base a esto, se ha descrito como CbpA debido a su gran capacidad para unirse a colina (Rosenow *et al.*, 1997), y como SpsA por su elevada unión a la fracción secretora de la inmunoglobulina humana IgA (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Hammerschmidt *et al.*, 2000). También existe una proteína denominada Hic que comparte una elevada homología con el dominio N-terminal de PspC que une factor H y por ello inhibe la activación de la vía alternativa del complemento (Janulczyk *et al.*, 2000; Jarva *et al.*, 2002). Realmente, el gen *hic* es esencialmente una variante alélica de *pspC* (Iannelli *et al.*, 2002).

PspC participa en la adhesión a células pulmonares que están activadas a través de citoquinas y juega un papel crítico en la colonización de la nasofaringe (Rosenow *et al.*, 1997) y en el establecimiento de la neumonía (Orihuela *et al.*, 2004). PspC interacciona con el receptor de la inmunoglobulina polimérica favoreciendo la invasión del epitelio a nivel de mucosas (Zhang *et al.*, 2000). Además, PspC contribuye a la invasión del sistema nervioso central participando en la diseminación a través de la barrera hematoencefálica mediante interacción con el receptor de laminina (Orihuela *et al.*, 2004; Orihuela *et al.*, 2009; Ring *et al.*, 1998). Una de sus principales funciones a nivel de respuesta inmune, es la de inhibir la inmunidad mediada por el sistema del complemento al reclutar factor H y evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento (Yuste *et al.*, 2010a).

1.4.3.4. Autolisina (LytA)

Algunas hidrolasas pueden causar eventualmente la lisis y consiguiente muerte de la bacteria, en cuyo caso son llamadas autolisinas. LA NAM-amidasa LytA (Figura 3) (Ronda *et al.*, 1987; Sánchez-Puelles *et al.*, 1986) y la lisozima LytC (García *et al.*, 1999a) son las únicas dos autolisinas de neumococo conocidas hasta la fecha. LytA está considerada como uno de los factores de virulencia más importantes de la bacteria y representa fundamentalmente el paradigma de enzima autolítica espontánea (tanto en la fase estacionaria como la producida

por determinados antibióticos) y la concomitante liberación de toxina (Ply) al medio extracelular (García y López, 1997; Paton *et al.*, 2000). Esta importante enzima posibilita que neumococo pueda acceder al torrente sanguíneo y difundirse a otras partes del organismo del hospedador promoviendo patologías invasivas (Berry y Paton, 2000). LytA se organiza estructuralmente como una proteína de dos módulos: un módulo N-terminal (residuos 1–172) que cataliza la escisión del enlace entre MurNAc y el residuo de Ala del péptido y un C-terminal (dominio de unión a colina o CBD, *choline binding domain*) (residuos 173–318), responsable de la unión a la pared celular y que está formado por un tándem de siete repeticiones (Fernández-Tornero *et al.*, 2002; Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Mellroth *et al.*, 2014). El papel de esta proteína en patogénesis ha sido demostrado previamente utilizando mutantes *lytA* que presentan una disminución significativa en la virulencia en diferentes modelos animales de infección (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). LytA es también parcialmente responsable de la intensa respuesta inflamatoria característica de la infección neumocócica al liberar componentes altamente proinflamatorios como fragmentos de la pared celular, TAs y LTAs, tras la lisis bacteriana (Davis y Weiser, 2011; Koedel, 2009; Majcherczyk *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2003; Moreillon y Majcherczyk, 2003; Sato *et al.*, 1996). Asimismo, se considera que LytA participa indirectamente en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis al liberar Ply y de forma directa al degradar C3b unido y evadir la activación de la vía clásica al reducir el contenido de colina en la envoltura bacteriana (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Además, esta autolisina es capaz de desintegrar con gran eficacia los biofilmes producidos por *S. pneumoniae in vitro* (Domenech *et al.*, 2011). Desde el punto de vista profiláctico, la inmunización con LytA ha demostrado poseer un efector protector frente a una posterior infección neumocócica (Berry *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 2011a).

1.4.3.5. Glucosaminidasa (LytB)

LytB se localiza en sitios cercanos a los extremos polares de la célula y se expone a la superficie celular. Está constituida por un dominio de unión a colina (CBD) en posición N-terminal que contiene 18 repeticiones de unión a colina (CBRs) seguido de un módulo catalítico que tiene actividad glucosaminidasa (Figura 3) (Bai *et al.*, 2014; De las Rivas *et al.*, 2002; López *et al.*, 2000). Esta proteína está implicada en la separación de las células hijas al final de la división celular, (García *et al.*, 1999a; García *et al.*, 1999b). La mureín hidrolasa LytB, más allá de su papel en la separación de células hijas (que tiene que ver con la dispersión celular), posee importantes funciones en la patogénesis de neumococo: (1) colonización de la nasofaringe; (2) adhesión e invasión en células del epitelio pulmonar humano; (3) disminución de la unión del componente clave del complemento C3b; y (4) evasión de la fagocitosis por los macrófagos alveolares y neutrófilos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). De hecho, LytB participa en el progreso de la neumonía y sepsis neumocócicas (Gosink *et al.*, 2000; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Por lo demás, es importante para la formación de biofilmes (Domenech *et al.*, 2013; Moscoso *et al.*, 2006). Recientemente, se ha observado la producción de anticuerpos anti-LytB en niños aquejados de otitis media aguda (Pichichero *et al.*, 2012) por lo que LytB podría ser un prometedor antígeno como candidato para el diseño de nuevas vacunas contra la enfermedad neumocócica.

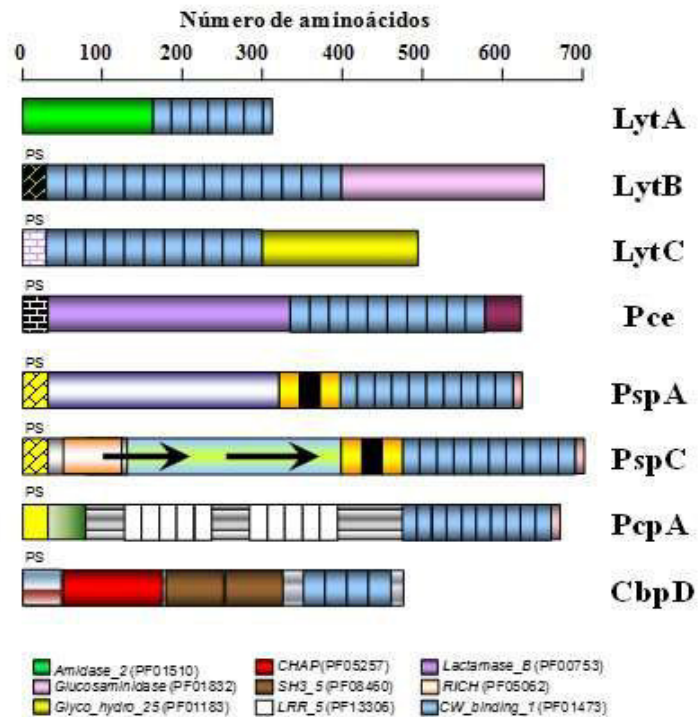


Figura 3. Representación esquemática de la organización modular de algunas CBPs de *S. pneumoniae*. Los diferentes módulos han sido denominados como se indica en la base de datos Pfam (versión 25.0) (Finn *et al.*, 2010). Las regiones homólogas se indican con idénticos colores y sombreados. PS, péptido señal.

1.4.3.6. Antígeno A de superficie neumocócica (PsaA)

PsaA es una lipoproteína de 37 kDa (Berry y Paton, 1996; Russell *et al.*, 1990) que pertenece a la familia de proteínas transportadoras de cationes esenciales, siendo de especial importancia su contribución a la captación y transporte de Mn^{2+} al interior celular (Claverys, 2001; Dintilhac *et al.*, 1997). Los mutantes en PsaA están atenuados en virulencia tanto en modelos de infección sistémica como en infecciones del tracto respiratorio y del oído medio (Berry y Paton, 1996; Marra *et al.*, 2002; McAllister *et al.*, 2004), quizás por su mayor sensibilidad a la muerte inducida por el peróxido de hidrógeno y los aniones superóxido (Johnston *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2002).

1.4.3.7. Lipoproteínas PiuA y PiaA

PiuA y PiaA son lipoproteínas que actúan como transportadores de tipo ABC participando en la captación y el transporte de hierro, aunque originalmente se denominaron como Pit1A y Pit2A, respectivamente (Brown *et al.*, 2001a). Se ha descrito que mutantes en PiuA y PiaA son necesarios para el crecimiento bacteriano y para la virulencia del microorganismo tanto en modelos de infección sistémica y neumonía neumocócica (Brown *et al.*, 2001a). PiuA y PiaA están altamente conservadas entre los diferentes serotipos por lo que podrían ser interesantes proteínas candidatas a vacuna.

1.4.3.8. Proteínas de la triada de histidinas (Pht)

Las proteínas de la familia Pht se caracterizan por poseer un motivo de poli-histidinas (HxxHxH) que se repite de cinco a seis veces en sus secuencias (Adamou *et al.*, 2001). Utilizando modelos murinos de sepsis y neumonía, se ha descrito que los mutantes Pht están atenuados en virulencia de modo que cuando se eliminan por completo *phtA*, *phtB*, *phtD* y *phtE* se produce una reducción muy significativa de la capacidad infectiva de neumococo (Ogunniyi *et al.*, 2009). Estas proteínas están ampliamente distribuidas en la población de neumococo y se encuentran muy conservadas con PhtD, PhtE, PhtB, y PhtA estando presentes en el 100%, 97%, 81%, y 62%, respectivamente de todas las cepas de neumococo analizadas por lo que podrían ser interesantes candidatas a vacuna (Hamel *et al.*, 2004; Rioux *et al.*, 2011).

1.4.3.9. Proteínas de superficie dependientes de sortasa

S. pneumoniae posee un grupo de proteínas de superficie diferente denominadas como proteínas dependientes de sortasa, que se caracterizan por poseer un dominio de unión a la pared de tipo LPXTG. La proteína que mejor se ha caracterizado es la neuraminidasa A (NanA) (Camara *et al.*, 1994; O'Toole *et al.*, 1971) que participa degradando residuos glicoconjugados de la matriz extracelular (Tettelin *et al.*, 2001). Por ejemplo, NanA hidroliza residuos de ácido siálico de glicoproteínas del hospedador, glicolípicos, mucinas y oligosacáridos favoreciendo la adhesión de neumococo a las superficies del epitelio y endotelio (King *et al.*, 2006). Los mutantes en NanA están atenuados en el proceso de colonización de la nasofaringe, así como en el desarrollo de otitis media y procesos invasivos tanto de pulmón como de la barrera hematoencefálica (Banerjee *et al.*, 2010; Berry y Paton, 2000; Manco *et al.*, 2006; Orihuela *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2000; Uchiyama *et al.*, 2009).

2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

Una vez establecido el estado de portador, *S. pneumoniae* puede diseminarse y colonizar e invadir el oído medio (produciendo otitis media), los pulmones (neumonía), atravesar la barrera hematoencefálica afectando al cerebro (meningitis) o diseminarse por la sangre (bacteriemia). No obstante, la aparición o no de síntomas de infección demuestra la importancia de determinados factores de interacción entre el hospedador y la bacteria (Henriques-Normark y Normark, 2010; Preston y Dockrell, 2008). Uno de los principales factores que determinan el tipo de relación hospedador-patógeno es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010); así, los neumococos de los serotipos 3, 6B y 19F son los más virulentos en adultos, mientras que los de serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F son los principales causantes de enfermedad invasiva en niños (Henriques-Normark y Normark, 2010).

Además, existen otros factores del hospedador que también influyen en la interrelación con el patógeno, tales como la edad (mayor incidencia de enfermedad neumocócica en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años), el estado inmunológico (personas inmunodeprimidas son más propensas a desarrollar enfermedad) (Brouwer *et al.*, 2009), la posible invasión previa del sistema respiratorio por otros agentes patógenos, como el virus de la gripe que potencia la capacidad de neumococo para colonizar, desarrollar enfermedad o ambos (McCullers, 2006; Wang *et al.*, 2011).

Se pueden distinguir principalmente tres etapas en el proceso de patogénesis: adhesión/colonización, invasión, e inflamación y shock.

2.1. Adhesión y colonización nasofaríngea

La colonización asintomática del tracto respiratorio superior por *S. pneumoniae* (estado de portador) precede, tanto a la infección localizada como a la ENI (Simell *et al.*, 2012). En la nasofaringe, *S. pneumoniae* se enfrenta a las barreras naturales de la mucosa respiratoria del hospedador, al sistema inmune y a otros microorganismos comensales, que podrían inhibir la colonización del neumococo (Tano *et al.*, 2000). Existen dos primeras barreras que pueden impedir, siquiera en parte, que el neumococo colonice la mucosa respiratoria: el moco y la lisozima (Coonrod *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2008). Para superar estas barreras, *S. pneumoniae* ha desarrollado varias estrategias. La evasión del moco tiene lugar mediante tres vías. En primer lugar, el CPS no se une a los residuos de ácido siálico presentes en la mucosa por su carga negativa, disminuyendo así la probabilidad de atrapamiento (Nelson *et al.*, 2007). En segundo lugar, el neumococo tiene varias exoglicosidasas (NanA, NanB, BgaA y StrH) que degradan los glicoconjugados del moco, disminuyendo así la viscosidad del mismo y evitando que la bacteria sea atrapada (Burnaugh *et al.*, 2008; King *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2001). En tercer lugar, la neumolisina Ply, una citolisina tiol-activada con afinidad por el colesterol, produce poros en las membranas celulares, disminuyendo los movimientos ciliares de las células epiteliales y permitiendo que el neumococo se adhiera a las mismas con más facilidad sin ser eliminado (Feldman *et al.*, 2002; Feldman *et al.*, 1990). En este proceso, la pared celular (Geelen *et al.*, 1993) y, en particular, los residuos de colina de los TAs, reconocen las moléculas del receptor del factor de activación plaquetaria (PAFR) de la superficie celular y se unen a él (Cundell *et al.*, 1995).

En el proceso de adherencia al epitelio de la mucosa participan diferentes proteínas de superficie de neumococo que se unen a carbohidratos del hospedador, así como a otras proteínas tanto del plasma como de la matriz extracelular eucariótica (Bergmann y Hammerschmidt, 2006). Así, se han descrito las exoglicosidasas neumocócicas (Berry *et al.*, 1996; Cámara *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1995; Jeong *et al.*, 2009; Pettigrew *et al.*, 2006; Zähler y Hakenbeck, 2000). La función de estas proteínas es, actuando aparentemente de manera coordinada, poner de manifiesto receptores glicosilados que facilitarían la adhesión del patógeno a las células del hospedador (Burnaugh *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2009; King, 2010; King *et al.*, 2006) así como, en una fase posterior de la infección, reducir la fijación del complemento a la superficie de la bacteria aumentando así la resistencia de ésta a la fagocitosis por los neutrófilos humanos (Dalia *et al.*, 2010).

Como ya se ha mencionado, otro grupo de proteínas a las que se les ha asignado un papel importante en colonización son las que tienen actividad proteasa, como HtrA, u otras proteínas de la superficie bacteriana como PspC, CbpG, BgaC o las hidrolasas de pared celular LytB y LytC (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). La presencia de pili en algunas cepas de neumococo es, asimismo, importante en el proceso de adhesión a las células epiteliales pulmonares favoreciendo, además, el proceso inflamatorio de la enfermedad. Una vez que el neumococo se localiza en la sangre, la presencia de pili parece influir en la gravedad de la patología infecciosa (Barocchi *et al.*, 2006).

2.2. Invasión

El proceso de invasión y diseminación de la ENI es todavía poco conocido. Normalmente ocurre después de la adquisición de un nuevo serotipo y raramente parece asociarse con una portación prolongada. La transcitosis es una importante estrategia utilizada por neumococo en la invasión del organismo que facilita, además, la existencia de reservorios bacterianos intraepiteliales y la recolonización posterior de la nasofaringe. Normalmente, neumococo atraviesa las células eucarióticas, sin multiplicarse, en el interior de vacuolas. La invasión puede también tener lugar directamente desde la nasofaringe al torrente sanguíneo (McCullers y Tuomanen, 2001). *S. pneumoniae* no puede adherirse al epitelio ciliado del árbol traqueo-bronquial lo que dificulta el acceso a los alveolos pulmonares. Este inconveniente podría explicar, al menos en parte, la relativamente baja incidencia de neumonía comparada con el elevado estado de portador. Se han descrito tres mecanismos por los que *S. pneumoniae* es capaz de atravesar la barrera epitelial: 1) Por un lado, la fosforilcolina (PCho) de los TAs y LTAs puede unirse al PAFR y activar las células epiteliales y endoteliales (Cundell *et al.*, 1995). Al unirse la PCho al PAFR, neumococo puede acceder a la membrana basal de la célula epitelial del hospedador y así producir ENI (Radin *et al.*, 2005). Es interesante señalar que la fosforilcolín esterasa de neumococo (Pce) es capaz no sólo de liberar residuos de PCho de la pared celular bacteriana sino, además, de degradar el PAF, por lo que se ha propuesto que esta enzima puede desempeñar un importante papel en la regulación de la virulencia de *S. pneumoniae* (Hermoso *et al.*, 2005). En ratones deficientes en el PAFR se observó una reducción no sólo en las tasas de colonización neumocócica, sino también en el desarrollo de la neumonía y ENI (Rijneveld *et al.*, 2004). Es interesante resaltar el hecho de que, como consecuencia de la infección de ciertos virus respiratorios como el de la gripe, el virus respiratorio sincitial o el coronavirus NL63, se produce un incremento notable en la biosíntesis del PAFR (García *et al.*, 2010; Golda *et al.*, 2011; Yokota *et al.*, 2010), aunque no está claro que este hecho esté directamente relacionado con una co-infección o posterior infección con neumococo, la gravedad de la misma o ambas (Golda *et al.*, 2011; McCullers *et al.*, 2008). 2) Un segundo mecanismo consiste en la unión de la proteína PpsC a la porción extracelular (ectodominio o componente secretor) del receptor de las inmunoglobulinas poliméricas (plgR) (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Hammerschmidt *et al.*, 2000). En condiciones normales, el plgR, que se expresa ampliamente en las células epiteliales del tracto respiratorio, permite el transporte de la IgA o IgM poliméricas a través de las barreras epiteliales, desde la zona basolateral hacia el lumen apical (Kaetzel, 2005). Adoptando la maquinaria de transcitosis inversa, la unión de neumococo al plgR a través de PspC conduce a la internalización y transcitosis de la bacteria a través de las capas epiteliales. PspC ha demostrado ser un factor importante para la colonización y enfermedad invasiva, aunque su efecto sobre la virulencia puede variar entre las cepas de neumococo (Agarwal *et al.*, 2010; Asmat *et al.*, 2011; Brock *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). 3) Un tercer mecanismo consiste en la invasión mediada por la unión de *S. pneumoniae* al plasminógeno y activación de éste. Neumococo contiene varias proteínas que unen plasminógeno favoreciendo así la adhesión de la bacteria a la superficie celular. Además, la activación de plasminógeno a plasmina, mediada por neumococo, permite degradar la cadherina del endotelio vascular posibilitando el acceso de neumococo a la membrana basal y así, en último extremo, el desarrollo de la ENI (Attali *et al.*, 2008b; Dejana *et al.*, 2008).

3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

3.1. Inmunidad humoral

3.1.1. Sistema del complemento

El sistema del complemento es una de las primeras líneas de defensa del sistema inmune frente a patógenos microbianos y desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune, tanto en la innata como en la adaptativa (Lambris *et al.*, 2008; Trouw y Daha, 2011). Está compuesto por aproximadamente, unas 30 proteínas tanto plasmáticas (solubles) como de superficie celular, que, tras reconocer al microorganismo invasor, inician una cascada de reacciones proteolíticas (Walport, 2001a). Estas proteínas están presentes tanto en la circulación sanguínea, como en otros tejidos o fluidos corporales y forman parte de tres cascadas diferentes de activación enzimática denominadas vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas. Algunas de las proteínas pueden formar parte de más de una vía como, por ejemplo, el componente C4 que es necesario tanto en la vía clásica como en la de las lectinas. Las tres vías del complemento son cascadas en las que cada componente es activado, mediante hidrólisis, en dos fragmentos. Estos fragmentos son designados con los sufijos “a” y “b”. Por ejemplo, C3 es escindida en dos fragmentos, C3a y C3b. Con la excepción de C2, los fragmentos de mayor tamaño que resultan como productos de hidrólisis de las proteínas del complemento son denominados “b” y los de menor tamaño “a”. Es importante resaltar que el fragmento grande de C2 fue inicialmente denominado C2a y aún es llamado así en algunas publicaciones.

Entre las numerosas funciones fisiológicas en las que participa el sistema del complemento (Figura 4), destaca la opsonización de microorganismos por el componente C3b el cual, al unirse a receptores específicos presentes en las células fagocíticas, facilita la fagocitosis posterior. También es importante la inducción de la respuesta inflamatoria que está mediada por los componentes C3a, C4a y C5a (denominadas anafilotoxinas) que aumentan la permeabilidad y vasoconstricción vascular con lo que, además, favorecen la migración de las células fagocitarias al sitio de infección (Walport, 2001a, b).

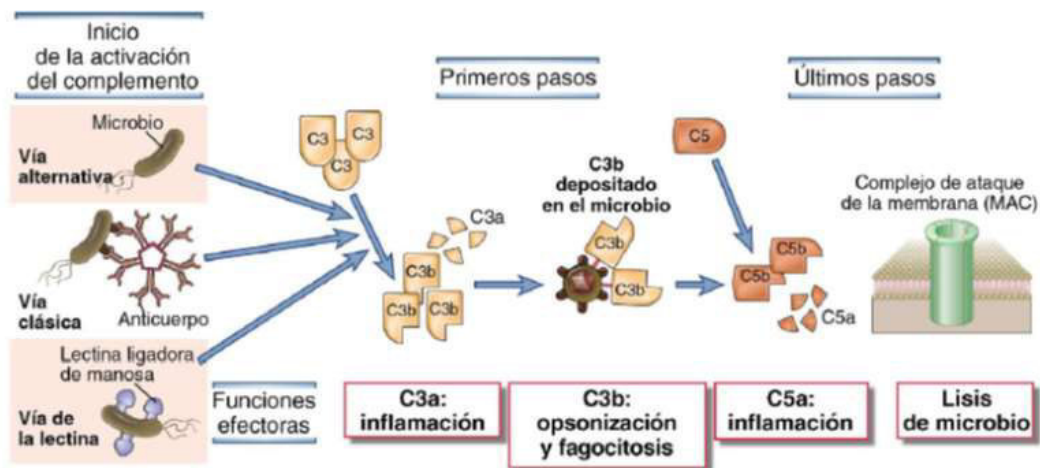


Figura 4. Vías de activación del complemento. La activación del sistema del complemento pueden iniciarla tres vías distintas que conducen a la producción de C3b (los primeros pasos). El C3b inicia los eventos tardíos de activación del complemento, que culminan en la producción de péptidos que estimulan la inflamación (C5a) y en el C9 polimerizado, que forma el complejo de ataque de la membrana, llamado así porque crea agujeros en la membrana plasmática. Se muestran las principales funciones de las proteínas más importantes producidas en diferentes pasos.

3.1.2. La vía clásica

La vía clásica se activa por la unión antígeno-anticuerpo, mediante la región Fc de las IgGs, a los dominios globulares de la molécula hexamérica C1 (Figura 3) (Celik *et al.*, 2001; Walport, 2001a). C1q forma parte del complejo C1 junto con C1r y C1s. En la última década se ha demostrado que la vía clásica también puede activarse, en ausencia de anticuerpos específicos, por medio de las IgM naturales, las proteínas de fase aguda [CRP, el componente amiloide del suero (SAP), o la pentraxina 3] y la lectina tipo-C, SIGNR-1 (Deban *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2006; Koppel *et al.*, 2005; Yuste *et al.*, 2007). Ratones deficientes en C1q muestran una respuesta inmune notablemente alterada y un peor pronóstico, en un modelo de meningitis (Rupprecht *et al.*, 2007). Resultados similares se han obtenido con ratones que carecen de SIGN-R1 (Kang *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que la vía clásica del complemento es una de las principales en la inmunidad innata frente a *S. pneumoniae* tanto en el ratón como en los seres humanos, lo que confirma su importancia tanto en el reconocimiento del patógeno como en su eliminación (Brown *et al.*, 2002a; Yuste *et al.*, 2008a).

3.1.3. La vía alternativa

La vía alternativa se activa por la unión covalente de pequeñas cantidades del componente C3b a grupos hidroxilo de carbohidratos y proteínas de la superficie neumocócica (aunque dicha unión no depende de un reconocimiento específico) (Schwaeble y Reid, 1999; Winkelstein *et al.*, 1980; Winkelstein y Tomasz, 1978), generado espontáneamente por la hidrólisis de C3, al factor B que es una serín-proteasa (Figura 4). Una vez producida esta unión, el factor D se encarga de hidrolizar al factor B, para formar la convertasa de la vía alternativa, C3bBb, permitiendo de este modo la amplificación de la activación del complemento. Esta vía se encuentra activada de forma constante, aunque de un modo muy

débil. Sin embargo, existen reguladores negativos que, en determinadas ocasiones, pueden interactuar con C3b evitando así la formación de la convertasa C3bBb e impidiendo que se produzcan fenómenos de autoinmunidad. La importancia de la vía alternativa en la opsonización de *S. pneumoniae* se puso en evidencia, además, en ratones con déficit de factor D y B, (Brown *et al.*, 2002a; Xu *et al.*, 2001). Asimismo, ratones deficientes en factor B, son más susceptibles a la otitis media producida por neumococo (Li *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2010).

3.1.4. La vía de las lectinas

La vía de las lectinas se inicia cuando las lectinas de unión a manosa (MBLs) o las ficolinas se unen, de un modo dependiente de Ca^{2+} , a carbohidratos que contienen residuos de *N*-acetilglucosamina o manosa (Endo *et al.*, 2011; Teizo *et al.*, 2004). Las MBL, también denominadas colectinas, son lectinas de tipo C que forman interacciones múltiples y cuya estabilidad depende de la distribución y geometría de los azúcares (Figura 4). Tanto las MBL como las ficolinas forman complejos con serín-proteasas tipo 2 (MASP-2) que permiten la formación de C4 y C2 originando, posteriormente, la misma convertasa de C3 producida a partir de la vía clásica. En el caso de neumococo, se ha observado que la ficolina L es capaz de unirse a determinados serotipos de neumococo como el 11F, 11A y 11D, reconociendo determinados componentes del CPS del serogrupo 11 ya que, en ausencia de la cápsula, no se observó ningún tipo de unión (Eisen, 2010; Krarup *et al.*, 2005). Por su parte, la ficolina M se une al CPS de los serotipos 19A y 19F reconociendo, posiblemente, residuos de *N*-acetilmanosamina (Kjaer *et al.*, 2013). Debido a que las MBL tienen una estructura muy similar a C1q, se ha sugerido que también pueden unirse a CR1 y, en consecuencia, podrían existir grandes paralelismos hasta ahora insospechados entre las vías clásica y de las lectinas en la activación del sistema del complemento estimulando directamente la fagocitosis (Wallis *et al.*, 2010). Hasta muy recientemente se aceptaba que la vía de las lectinas desempeñaba un papel poco relevante en el desarrollo de la enfermedad neumocócica ya que, por ejemplo, los polimorfismos en MBL, uno de los activadores principales de esta vía, no parecían estar asociados con un mayor riesgo de ENI (Moens *et al.*, 2006). No obstante, otras investigaciones más recientes sí han encontrado una asociación entre la susceptibilidad a la ENI y la homocigosis para uno de los tres polimorfismos del gen *MBL2* (Brouwer *et al.*, 2009; Eisen, 2010). Estudios recientes utilizando ratones deficientes en diversas lectinas, han confirmado que estos animales tienen una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica (Ali *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2012). Resultados similares han sido encontrados en humanos (García-Laorden *et al.*, 2013; Garnacho-Montero *et al.*, 2012).

3.1.5. Oponofagocitosis

La fagocitosis es el proceso en el que las células fagocíticas profesionales del sistema inmune, tales como, neutrófilos, macrófagos o células dendríticas, ingieren partículas sólidas, células muertas y agentes patógenos y las introducen al interior celular para posteriormente proceder a su eliminación. En la fagocitosis microbiana, diferentes proteínas séricas (opsoninas) se unen y reconocen a los patógenos para su eliminación (Marriott y Dockrell, 2007). En este proceso, los fagocitos expresan receptores de alta afinidad para ciertas opsoninas, como las moléculas de anticuerpos (inmunoglobulinas de tipo IgG, IgM, IgA) así como las proteínas del complemento (C3b).

El proceso de fagocitosis se puede dividir en varios pasos. En primer lugar, tras el primer contacto de los fagocitos con el patógeno invasor, se internalizan los microorganismos en vacuolas derivadas de la membrana plasmática denominadas fagosomas. Después de la escisión de la membrana, los fagosomas sufren un proceso complejo de maduración fusionándose secuencialmente con endosomas y lisosomas y, finalmente, se originarían los denominados fagolisosomas, unos orgánulos muy ácidos (pH 4.5) y ricos en hidrolasas que degradan las bacterias internalizadas (Botelho y Grinstein, 2011; Fairn y Grinstein, 2012). En los fagolisosomas, los patógenos son eliminados por una combinación de mecanismos oxidativos y no oxidativos (Dahlgren y Karlsson, 1999; Nauseef, 2007; Robinson, 2009; Urban *et al.*, 2006).

4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

4.1. Prevención

4.1.1. Perspectiva histórica

Las primeras descripciones llevadas a cabo para prevenir el desarrollo de la ENI se basaron en la utilización de estrategias profilácticas en la primera década del siglo XX incluso antes mismo de que se demostrara que los polisacáridos capsulares bacterianos eran los que verdaderamente conferían inmunogenicidad. En 1911, Almroth E. Wright y colaboradores desarrollaron una vacuna que consistió en una mezcla celular de neumococos inactivados por calor. De hecho, inicialmente inmunizaron trabajadores de una mina de oro de Sudáfrica, que era un grupo poblacional con una alta incidencia de infecciones neumocócicas (Lister, 1916, 1917; Maynard, 1915; Wright *et al.*, 1914). Algo más tarde, se hicieron más pruebas incluyendo militares de Estados Unidos. (Cecil y Austin, 1918). Lamentablemente, esta vacuna tuvo un éxito muy limitado debido a una dosis inadecuada y a que sólo protegía frente a dos serotipos de neumococo, principalmente debido a que, en aquellos tiempos, se desconocía la enorme variabilidad serológica de neumococo. El mayor avance en este campo sucedió años más tarde, gracias al aislamiento de los polisacáridos capsulares, (Heidelberger y Avery, 1923). Estos científicos fueron los pioneros en aislar e identificar la cápsula de neumococo como una sustancia de naturaleza polisacáridica que cubría la superficie de la bacteria (Heidelberger y Avery, 1924; Heidelberger *et al.*, 1925). Gracias a estos hallazgos, se activó el desarrollo de vacunas compuestas por polisacáridos capsulares purificados contra *S. pneumoniae*.

El desarrollo de vacunas contra neumococo se basó en el hecho bien contrastado de que los anticuerpos frente a un serotipo capsular protegían de una infección posterior causada por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentasen alguna reacción cruzada con aquel (Avery y Goebel, 1933; Heidelberger, 1933; Lyall y Odell, 1939; Welch *et al.*, 1939). Estos trabajos culminaron con la elaboración de una vacuna antineumocócica 4-valente, basada en la combinación de CPS de los serotipos 1, 2, 5 y 7 (MacLeod *et al.*, 1945). Sin embargo, con la introducción de la penicilina (PEN) y sulfonamidas, el desarrollo de nuevas vacunas frente a neumococo perdió interés principalmente debido a la elevada eficacia de la terapia antibiótica (Austrian, 1981). Sin embargo en la década de los 60, Austrian y colaboradores observaron que, a pesar de la aparente eficacia terapéutica de la PEN *in vitro*, la neumonía neumocócica causaba más muertes en EE.UU. que ninguna otra enfermedad infecciosa (Austrian y Gold,

1964). Esta observación permitió al Instituto Nacional de la Salud (NIH) recomendar la utilización de fondos gubernamentales para el desarrollo de vacunas frente a neumococo invirtiendo más de 6 millones de dólares para este fin. Este hecho, junto a la emergencia de neumococos multirresistentes, dio lugar a un nuevo interés por la vacunación frente a neumococo.

4.1.2. Vacunas constituidas por polisacáridos capsulares

Como ya se ha expuesto, las primeras vacunas frente a neumococo se basaban en el CPS. Debido a que ciertos serotipos eran los más frecuentes en el desarrollo de la ENI, se elaboró una vacuna compuesta por los tipos capsulares más prevalentes, que en un principio constaba de 14 (14-valente) (Austrian *et al.*, 1976) y, más tarde, de 23 polisacáridos capsulares (PPSV 23). La actual vacuna polisacáridica 23-valente comercializada (Pneumovax[®], Merck & Co. INC), contiene polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Esta vacuna reduce el riesgo de infección sistémica en la población adulta y, de hecho, se utiliza en la actualidad en la inmunización de adultos. Entre las principales limitaciones de esta vacuna es que no está recomendado su uso para inmunizar a la población pediátrica, que son uno de los principales grupos de riesgo de ENI, debido a la pobre inmunogenicidad que genera ya que los niños menores de 2 años de edad, no responden a los polisacáridos capsulares por ser antígenos de tipo T independiente (Pomat *et al.*, 1994).

4.1.3. Vacunas conjugadas

La vacuna neumocócica conjugada heptavalente (PCV7; Prevenar[®], Pfizer) fue la primera vacuna conjugada que se comercializó para su uso en población pediátrica. Las vacunas conjugadas, utilizan, como antígenos, oligosacáridos purificados de cada CPS siendo 2 µg para los CPS de tipo 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 4 µg del 6B, que están conjugados individualmente de forma covalente con 20 µg de una fracción proteica (proteína portadora) para aumentar su capacidad inmunogénica. Como proteínas transportadoras se pueden utilizar la CRM₁₉₇, que es una variante no tóxica de la toxina diftérica —una proteína de la membrana externa de meningococo B— o el toxoide tetánico que son capaces de estimular la respuesta mediada por linfocitos T por lo que sí generan memoria inmunológica. Esta unión del CPS a la proteína transportadora, transforma el comportamiento T-independiente del CPS en T-dependiente, lo que posibilita una respuesta inmune efectiva a partir de los dos meses de vida y una memoria inmune permanente (American Academy of Pediatrics – Committee on Infectious Diseases, 2000; Lesinski y Westerink, 2001). La introducción de la vacuna PCV7 en el calendario vacunal infantil de EE.UU. y Europa (2001 en España), permitió una rápida disminución tanto de los casos de otitis media aguda (Fletcher y Fritzell, 2007) como los de ENI provocados por los serotipos incluidos en la vacuna (Fenoll *et al.*, 2009b). Sin embargo, la colonización por neumococo no disminuyó significativamente debido a la aparición de un reemplazo de los serotipos por serotipos no incluidos en la PCV7, en particular el producido por el serotipo 19A cuya prevalencia en enfermedad infantil se incrementó considerablemente (Pilishvili *et al.*, 2010; Reinert *et al.*, 2010). Para combatir este reemplazamiento de serotipos, se inició el desarrollo de vacunas con una mejor cobertura, culminando en la comercialización de las vacunas 10-valente (PCV10; denominada Synflorix[™]; GlaxoSmithKline) que incluyen los CPS

de la PCV7 más los serotipos 1, 5 y 7F y la vacuna conjugada 13-valente (PCV13; Prevenar-13[®]; Pfizer) que incluye los de la PCV7 más los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A. Para incrementar la cobertura de serotipos, Merck ha desarrollado recientemente un vacuna conjugada 15-valente que contiene el CPS de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, conjugados a CRM₁₉₇ y formulada con fosfato de aluminio como adyuvante, aunque todavía está en fase de evaluación (Skinner *et al.*, 2011).

Aunque aún es pronto para evaluar el impacto de las nuevas vacunas conjugadas PCV10 y PCV13, existen evidencias que demuestran que son eficaces reduciendo el estado de portador y la ENI excepto para el serotipo 3 (Fenoll *et al.*, 2015). Sin embargo, el aumento de casos de ENI producidos por serotipos no incluidos en la vacuna PCV13 están siendo cada vez más frecuentes (Aguinagalde *et al.*, 2015)

4.1.4. Proteínas neumocócicas como antígenos vacunales

Las principales limitaciones impuestas por las vacunas basadas en polisacáridos capsulares bacterianos consisten en el restringido número de serotipos frente a los que protegen (los incluidos en la misma y, en determinados casos, alguno más adicional con el que puede presentar reacción cruzada), así como el alto coste de cada dosis. Otro inconveniente es que desde el punto de vista de su producción, el número de CPS diferentes que se pueden conjugar es limitado y el fenómeno de “reemplazo de serotipos” por otros no presentes en la vacuna es relativamente frecuente (Weinberger *et al.*, 2011). Por ello, existen un gran interés en la identificación y caracterización de posibles antígenos proteicos de neumococo que estén conservados en la gran mayoría de serotipos, que sean inmunogénicos y que los anticuerpos generados sean protectores frente a la amplia diversidad de serotipos de neumococo en la lucha frente a la ENI. Sobre estas bases mencionadas, los principales estudios se han centrado en la caracterización de diversas proteínas que actúan como importantes factores de virulencia del microorganismo como posibles candidatas a vacuna (Plumptre *et al.*, 2012).

A continuación, se menciona brevemente los principales hallazgos con las proteínas más relevantes que se han caracterizado como candidatas a vacuna:

4.1.4.1. Neumolisina

La Ply fue la primera proteína de neumococo que se caracterizó como posible antígeno vacunal, gracias a estudios realizados en los que se inmunizaron ratones con el toxoide purificado proporcionando protección frente a la neumonía invasiva producida por neumococos virulentos (Paton *et al.*, 1983). El principal mecanismo por el que se cree que los anticuerpos frente a Ply son protectores es porque son capaces de neutralizar la toxina que se libera al medio tras la lisis de neumococo. Aunque existen evidencias que sugieren que una determinada fracción de Ply está asociada a la pared celular (Price y Camilli, 2009; Price *et al.*, 2012), no hay suficiente información sobre si los anticuerpos frente a Ply participan en la eliminación a través del proceso de opsonofagocitosis. Un inconveniente que presenta es que a pesar de que la neumolisina es una proteína capaz de proteger en ratones, no es válida para su uso en humanos, debido a su elevada toxicidad. Para evitar este inconveniente, se han construido versiones alteradas de la proteína que no están relacionadas con su toxicidad como posibles antígenos vacunales (Alexander *et al.*, 1994; Farrand *et al.*, 2010; Kirkham *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 2014; Paton *et al.*, 1991). De este modo, la inmunización con una versión de la

proteína que contiene la mutación Trp433-Phe (denominada PdB) proporciona cierto grado de protección frente a diferentes serotipos de neumococo (Alexander *et al.*, 1994). Otra versión truncada de la proteína denominada Pdt, con tres mutaciones puntuales (Cys428-Gly, Trp433-Phe, and Asp385-Asn), que elimina por completo la actividad citolítica, también ha mostrado actividad protectora frente a dos aislados clínicos del serotipo 1 de neumococo (Harvey *et al.*, 2011). Estas versiones modificadas de la proteína Ply, también podrían utilizarse como proteínas transportadoras de CPS en vacunas conjugadas (Lee *et al.*, 1994; Michon *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1991). Estas vacunas conjugadas con estas proteínas, tendrían la ventaja de proporcionar anticuerpos frente al CPS y, además, anticuerpos frente a Ply por lo que podrían proteger frente a neumococos de serotipos homólogos y heterólogos, evitando uno de los principales problemas de las vacunas conjugadas como es su limitada protección debida a la especificidad por el CPS.

Otra ventaja que tendría la inmunización con Ply es que los humanos son capaces de producir respuesta de anticuerpos frente a Ply como consecuencia de la exposición natural al microorganismo dentro del contexto de una infección o por colonización persistente, y, además, la inmunización pasiva de ratones con anticuerpos frente a Ply de origen humano también confirió cierto grado de protección, lo que sugiere que la Ply es inmunogénica en humanos (Musher *et al.*, 2000). De hecho, estudios recientes han mostrado la eficacia e inmunogenicidad de varios derivados de Ply en niños pequeños y adultos (Kamtchoua *et al.*, 2013; Leroux-Roels *et al.*, 2014; Prymula *et al.*, 2014). Sin embargo, es evidente que los estudios pre-clínicos realizados hasta la fecha, indican que la utilización de derivados de Ply con fines profilácticos no proporciona un grado de protección adecuado como para ser considerados en una futura vacuna proteica constituida por un único antígeno vacunal, especialmente frente a aislados de neumococo con alta capacidad virulenta. En este sentido, es importante destacar que el mecanismo de protección de los anticuerpos frente a Ply es mediante neutralización de la actividad tóxica de Ply más que la estimulación del sistema inmune para eliminar al microorganismo a través de los fagocitos profesionales.

4.1.4.2. Proteína A de superficie neumocócica

PspA está expresada en todos los aislados de neumococo estudiados y, de hecho, fue la primera perteneciente a la familia de proteínas de unión a colina (CBPS, *choline binding proteins*) que se caracterizó como posible candidata a vacuna (Hollingshead *et al.*, 2006; McDaniel *et al.*, 1987). El mecanismo de protección frente a la infección neumocócica, está relacionado con la eliminación del microorganismo dependiente de la fagocitosis mediada por el sistema del complemento. PspA participa en virulencia al interferir con este proceso reduciendo la eliminación de neumococo de la circulación sistémica (McDaniel *et al.*, 1987; Tu *et al.*, 1999) al impedir la activación del sistema del complemento en la superficie bacteriana (Li *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2004). Un aspecto beneficioso que puede suponer la utilización de PspA como candidata a vacuna es que ha mostrado efectos protectores aditivos en combinación con otras proteínas frente a la colonización nasal, la otitis media aguda y la infección invasiva (Briles *et al.*, 2000a; Briles *et al.*, 2000b; Briles *et al.*, 2003; Kono *et al.*, 2011; Melin *et al.*, 2012; Ogunniyi *et al.*, 2000; Ogunniyi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 1997). Además, al igual que se ha demostrado con variantes de Ply, también podría conjugarse PspA con el CPS mostrando efectos protectores en modelos murinos (Csordas *et al.*, 2008; Perciani *et al.*, 2013). Entre los principales inconvenientes de PspA como candidata a vacuna es que es una proteína

polimórfica en la que se han descrito hasta 3 familias diferentes, y que los anticuerpos frente a PspA reaccionan con la miosina cardiaca humana pudiendo producir inflamación cardiaca y fenómenos de autoinmunidad (Ginsburg *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2003).

4.1.4.3. Proteína C de superficie neumocócica

PspC es una proteína polimórfica que al igual que PspA también pertenece a la familia de las CBPS y presenta una estructura alélica muy variable (Brooks-Walter *et al.*, 1999) (Dave *et al.*, 2001). La inmunización con PspC confiere protección en ratones frente a la ENI, y, además, genera cierta protección cruzada con algunos dominios de PspA (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Ogunniyi *et al.*, 2001). La vacunación con la región de la proteína PspC que está relacionada con la unión a factor H, tan solo protege frente a la infección sistémica producidas por la cepa homóloga de la cual se purificó el antígeno vacunal (Ricci *et al.*, 2011). La inmunización intranasal con PspC ha mostrado cierto grado de protección frente al estado de portador (Balachandran *et al.*, 2002), pero no frente a la neumonía (Ferreira *et al.*, 2009). Al igual que PspA, la proteína PspC en combinación con otras proteínas de neumococo, permite alcanzar niveles de protección aditivos, aunque la actividad protectora varía en función de la cepa infectante y de la vía de inoculación (Briles *et al.*, 2000a; Briles *et al.*, 2003; Ogunniyi *et al.*, 2000; Ogunniyi *et al.*, 2007; Ogunniyi *et al.*, 2001).

4.1.4.4. Autolisina

LytA es la principal autolisina de neumococo y fue una de las primeras CBPS de las que se caracterizó su función fisiológica (García *et al.*, 1986; Hóltje y Tomasz, 1976). La inmunización de ratones con LytA purificada, proporciona cierto grado de protección frente a la ENI (Lock *et al.*, 1992). Sin embargo, aunque la protección conferida por la inmunización individual de LytA y Ply fue similar para ambas proteínas, no se observó efecto aditivo o sinérgico cuando se combinaron las dos proteínas (Lock *et al.*, 1992). Además, la inmunización con LytA no protegió frente a un mutante de Ply sugiriendo que el principal mecanismo por el que los anticuerpos de LytA protegen se debe a que podrían impedir la liberación de Ply (Lock *et al.*, 1992). Recientemente, la inmunización intranasal con LytA mostró protección cruzada frente a diferentes serotipos en un modelo murino de colonización y ENI (Yuan *et al.*, 2011a). Un posible inconveniente es que se ha descrito que LytA puede presentar variación alélica lo que podría limitar su uso como posible candidata a vacuna (Gillespie *et al.*, 1997).

4.1.4.5. Glucosaminidasa

La proteína LytB tiene actividad *N*-acetilglucosaminidasa y juega una función esencial en la separación de células hijas durante el proceso de división celular (De las Rivas *et al.*, 2002; García *et al.*, 1999b). No se ha caracterizado en detalle el papel de esta proteína como posible candidata a vacuna, aunque sí que se ha identificado la presencia de anticuerpos frente a LytB en niños con otitis media aguda (Pichichero *et al.*, 2012) y, además, se ha sugerido que los anticuerpos anti-LytB pueden inducir protección frente a la infección neumocócica en modelos murinos aunque el posible mecanismo por el que protege se desconoce (Wizemann *et al.*, 2001).

4.1.4.6. Antígeno A de Superficie Neumocócica

PsaA es una proteína altamente conservada por lo que podría ser un atractivo antígeno vacunal (Sampson *et al.*, 1997). De hecho, la inmunización con PsaA induce una relativa protección frente a la colonización la ENI en modelos murinos (Briles *et al.*, 2000a; Oliveira *et al.*, 2006; Talkington *et al.*, 1996). Sin embargo, otros estudios muestran que la protección mediada por PsaA es menor que la conferida por variantes truncadas de Ply frente a la sepsis neumocócica (Gor *et al.*, 2002; Ogunniyi *et al.*, 2000). Uno de los principales inconvenientes de PsaA como candidata a vacuna, es que no está expuesta en la superficie, y por ello, no genera anticuerpos capaces de inducir opsonización, de modo que la interacción de PsaA con los anticuerpos frente a esta proteína dependerá del grosor de la cápsula y por tanto, variará en función del aislado de neumococo y del serotipo (Ogunniyi *et al.*, 2002). Una posible utilización de PsaA como antígeno vacunal sería frente a la colonización de la nasofaringe ya que, en este hábitat, neumococo produce poca cápsula y la expresión de proteínas es mayor. De hecho, la inmunización con PsaA redujo las tasas de colonización por neumococo (Briles *et al.*, 2000a; De *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2009). Otro inconveniente con esta proteína es que se ha descrito en otras especies del grupo mitis como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus anginosus* lo que podría limitar su uso como antígeno vacunal específico frente a neumococo.

4.1.4.7. Lipoproteínas PiuA y PiaA

PiuA y PiaA son proteínas que están ampliamente conservadas entre los diferentes serotipos y participan en patogénesis de un modo indirecto mediante la captación de hierro que es esencial para la virulencia del microorganismo. La inmunización activa y pasiva con PiuA, PiaA o la combinación de ambas, ha mostrado ser protectora frente a la infección sistémica en modelos animales (Brown *et al.*, 2001b; Ogunniyi *et al.*, 2012). Los anticuerpos frente a estas proteínas inducen la fagocitosis dependiente de complemento y bloquean la captación y el transporte de hierro (Jomaa *et al.*, 2005). Se ha descrito la presencia de niveles elevados de anticuerpos frente a PiuA y PiaA en sueros humanos procedentes de pacientes convalecientes con sepsis neumocócica lo que sugiere que esta proteína es inmunógena en humanos (Whalan *et al.*, 2005).

4.1.4.8. Proteínas de la triada de histidinas

Las proteínas que pertenecen a la familia Pht se encuentran relativamente bien conservadas en la población de neumococo (Adamou *et al.*, 2001). La inmunización activa con PhtA, PhtB, y/o PhtE mostró protección frente a la colonización de la nasofaringe (Zhang *et al.*, 2001), neumonía (Hamel *et al.*, 2004), y sepsis (Adamou *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 2004) frente a aislados clínicos de varios serotipos. Los estudios de inmunización pasiva con estas proteínas, sugieren que la opsonofagocitosis mediada por anticuerpos podría ser el principal mecanismo de protección tras la vacunación con PhtB y PhtE (Hamel *et al.*, 2004). De las cuatro proteínas, PhtD se considera como la candidata más prometedora debido a que su

eficacia frente a la colonización es mayor y porque su nivel de conservación entre la población de neumococo es superior al de las otras proteínas de la familia Pht (Godfroid *et al.*, 2011; Rioux *et al.*, 2011). Sin embargo, la capacidad protectora de PhtD frente a la infección sistémica por neumococo es moderada (Plumptre *et al.*, 2013).

4.1.4.9. Proteínas de superficie dependientes de sortasa

En este grupo de proteínas, existe una variedad de posibles antígenos vacunales que participan en diferentes aspectos de la virulencia del microorganismo como se ha comentado previamente. La inmunización con proteína NanA ha mostrado ser relativamente protectora en modelos animales de colonización (Tong *et al.*, 2005) otitis media (Long *et al.*, 2004) y frente a la sepsis neumocócica en modelos de ratones jóvenes (Lock *et al.*, 1988). Otra proteína de esta familia de la que hay algunas evidencias profilácticas sería la proteasa de IgA1. La inmunización con esta proteína proporcionó un cierto grado de protección frente a la neumonía neumocócica (Audouy *et al.*, 2007). Por último, las fimbrias o los pili, son otra clase de proteínas dependientes de sortasa que podrían ser utilizadas como posibles candidatas a vacuna (Barocchi *et al.*, 2006). El pili de neumococo contiene varias subunidades de proteínas entre las que se encuentran RrgA (la principal subunidad), RrgB (la subunidad de la cola) y RrgC (la subunidad de anclaje). De todas ellas, la subunidad RrgA utilizada como inmunógeno, protege frente a los neumococos que producen pili (Moschioni *et al.*, 2012; Moschioni *et al.*, 2010). El principal factor limitante de estas proteínas como candidatas a vacuna universal frente a neumococo, es que tan sólo un 20-30% de los aislados clínicos, expresan pili (Basset *et al.*, 2007; Moschioni *et al.*, 2010).

4.2. Tratamiento

4.2.1. Las lisozimas, un tipo de mureín-hidrolasas

Las lisozimas o *N*-acetilmuramidasa (EC 3.2.1.17) son hidrolasas que rompen específicamente el enlace β -1,4- existente entre el MurNAc y el GlcNAc del peptidoglicano bacteriano (es decir, el extremo reductor) (Figura 5). Las lisozimas se sintetizan tanto en animales, como en plantas y bacterias, y forman parte de una de las familias de enzimas más antiguas y eficaces de la naturaleza. Desde el punto de vista evolutivo, se originaron a partir de genes de bacteriófagos y/o bacterias codificantes de enzimas líticas de pared que, posteriormente, dieron lugar a todas las subfamilias conocidas (Masschalck y Michiels, 2003). De todas ellas, la más empleada y estudiada es la lisozima de clara de huevo (HEWL, *Hen Egg White Lysozyme*).

4.2.2. Lisozimas presentes en *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos

Las muramidasa o lisozimas codificadas por *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos pertenecen a la familia GH-25 de las glicosilhidrolasas (Felch *et al.*, 1975; Lichenstein *et al.*, 1990). A este grupo pertenecen LytC, codificada por la bacteria, y las endolisinas Cpl-1, Cpl-7 y Cpl-9, codificadas por los bacteriófagos Cp-1, Cp-7 y Cp-9, respectivamente. Todas ellas dependen de la presencia de los residuos de PCho para su unión a la pared y su máxima

actividad enzimática, con la excepción de Cpl-7 que presenta un módulo de unión a la pared (CWBM, *Cell Wall Binding Module*) totalmente diferente al resto.

La endolisina Cpl-1 codificada por el fago Cp-1, tiene una masa molecular de 39.2 kDa y difiere en sólo 10 aminoácidos (9 de ellos en el módulo catalítico) de la lisozima Cpl-9 (García *et al.*, 1990). En ambas endolisinas el CBD, situado en posición C-terminal, está formado por 6 CBRs (Monterroso *et al.*, 2005; Monterroso *et al.*, 2008). Un caso único dentro de la familia es Cpl-7. Esta lisozima tiene una masa molecular de 38.4 kDa, siendo capaz de hidrolizar indistintamente paredes que contengan colina o etanolamina. Estructuralmente, el módulo catalítico comparte un 85.6% de la secuencia con el de Cpl-1 (27 aminoácidos diferentes), mientras que el CWBM es absolutamente distinto y está formado por 3 repeticiones (CW_7) idénticas no sólo en aminoácidos —48 aminoácidos por repetición— sino también en nucleótidos (Fig. 5).

4.3. Lisozimas con actividad antineumocócica

Una reciente estrategia antibacteriana ha sido la desarrollada por V. Fischetti, consistente en el uso de enzimas líticas fágicas, también denominadas endolisinas, lisinas o enzibióticos (Fischetti, 2010). Estas enzimas están codificadas por bacteriófagos y rompen enlaces específicos de la pared celular de la bacteria, provocando la lisis y, por tanto, la muerte bacteriana. Además, aportan grandes ventajas frente a los antibióticos tradicionales, como su especificidad por el patógeno —evitando así la alteración de la microbiota normal— la baja posibilidad de desarrollar resistencia y su rápido efecto bactericida, entre otras (Pastagia *et al.*, 2013).

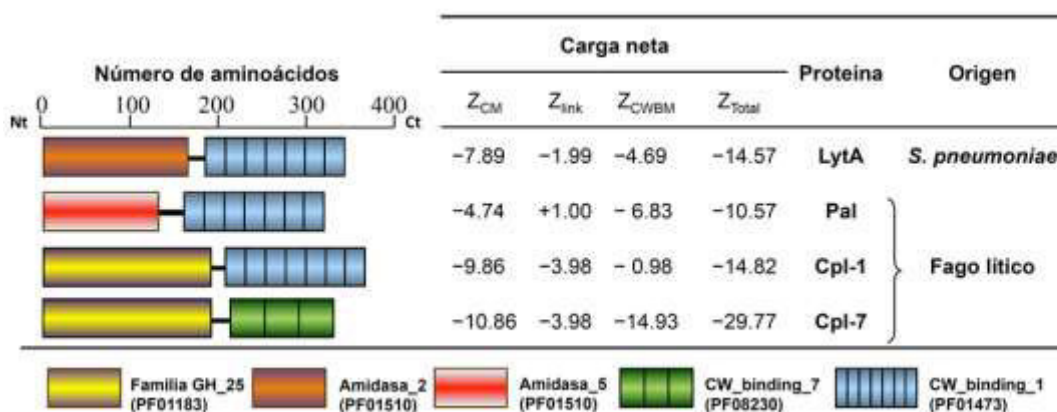


Figura 5. Representación esquemática de la organización modular de la principal autolisina de neumococo LytA y algunas endolisinas. Los diferentes módulos han sido denominados como se indica en la base de datos Pfam (versión 25.0) (Finn *et al.*, 2010). Las regiones homólogas se indican con idénticos colores y sombreados. Las cargas netas se representan Z_{CM} , carga neta referida al módulo catalítico; Z_{link} , carga neta referida al *linker*; Z_{CWBM} , carga neta referida al módulo de unión a sustrato; Z_{total} , carga neta total.

Actualmente, se conocen diferentes enzimas fágicas con propiedades antimicrobianas frente a *S. pneumoniae*: Cpl-1, Pal (Jado *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2003), Cpl-7 (Bustamante *et al.*, 2010) o Cpl-7S (Díez-Martínez *et al.*, 2013). A pesar de que son exiguas las publicaciones respecto a *S. pneumoniae*, también resulta interesante el estudio de sinergia entre dichas enzimas y los antibióticos más utilizados en el tratamiento de infecciones

neumocólicas. La sinergia se define como la interacción positiva entre dos compuestos cuando son administrados de forma conjunta. Por ejemplo, se ha descrito en neumococo una potenciación del efecto de la lisozima Cpl-1 al administrarse junto con gentamicina, daptomicina o cefotaxima (Djurkovic *et al.*, 2005; Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007; Vouillamoz *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado un efecto sinérgico *in vitro* en cepas de estreptococo entre las enzimas λSA2 y B30 (Schmelcher *et al.*, 2015) y una potenciación *in vivo* del efecto lítico entre las enzimas Pal y Cpl-1 (Jado *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha descrito la construcción de una endolisina quimérica de origen sintético, Cpl-711, obtenida a partir de las lisozimas fágicas Cpl-1 y Cpl-7S y que presenta la mayor actividad bactericida frente a neumococo descrita hasta el momento. Cpl-711 posee el dominio catalítico de la endolisina Cpl-7S mientras el conector y el dominio de unión a pared pertenecen a Cpl-1 (Figura 6) (Díez-Martínez *et al.*, 2015).

4.3.1. Fagoterapia y enzibióticos

La capacidad de los bacteriófagos de lisar a sus bacterias hospedadoras, su amplia distribución y su elevada especificidad hicieron que estas entidades biológicas fueran propuestas desde un principio como herramientas de control de la población bacteriana.

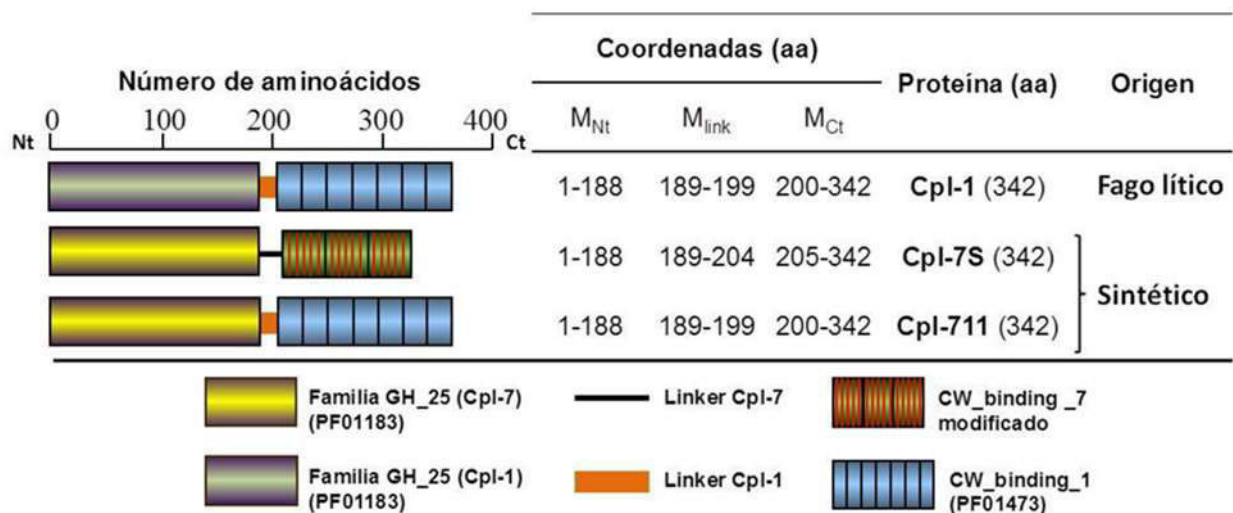


Figura 6. Representación esquemática de las lisozimas parentales y la quimera. Construcción de las lisozimas sintéticamente a partir de sus fragmentos de DNA correspondientes.

Los primeros investigadores que utilizaron los fagos como agentes antimicrobianos fueron Félix d'Hérelle y F.W. Twort en la primera década del siglo XX siendo capaces de demostrar las placas de lisis que se producían cuando se añadían extractos obtenidos de aguas fecales a cultivos bacterianos apropiados y a partir de entonces, la terapia fágica fue una práctica muy común en EE.UU., Europa así como en la antigua URSS (Brussow, 2005; García y López, 2002). Sin embargo, el escaso conocimiento de la biología de los fagos, la falta de resultados concluyentes y el descubrimiento de los antibióticos hicieron que tanto en Europa occidental como en EE.UU., se abandonara progresivamente esta estrategia. En cambio se mantuvo en Europa Oriental, especialmente en el Instituto Eliava de Tiflis (Georgia), donde siguieron desarrollando técnicas para la obtención, purificación y selección de bacteriófagos utilizados contra una variedad de infecciones bacterianas (Hanlon, 2007).

La capacidad de los antibióticos para curar enfermedades infecciosas que en el pasado eran mortales está viéndose seriamente amenazada debido al incremento progresivo de cepas multirresistentes. A esto se añade la dificultad de obtener nuevos fármacos dirigidos a nuevas dianas terapéuticas. Debido a estos inconvenientes, hace algunas décadas se relanzaron los estudios de terapia fágica sobre infecciones en animales con resultados esperanzadores (Smith y Huggins, 1982, 1983). Se puede decir que a partir de estos ensayos la utilización de fagos (o de sus productos) está viviendo una época de renovado interés científico y de gran esperanza para el tratamiento de ciertas infecciones recalcitrantes.

La terapia fágica es una estrategia basada en productos naturales, como son los viriones o alguno de sus productos codificados en el genoma fágico. Los viriones presentan características destacadas, entre ellas, la elevada especificidad (evitando así disbiosis y desarrollo de infecciones secundarias), la inexistencia de efectos secundarios graves, así como un aislamiento fácil con costes de producción significativamente menores a los de otros antibacterianos. No obstante, hay que tener en cuenta algunos inconvenientes que deben ser seriamente considerados como la dificultad para obtener preparaciones de gran pureza, así como la conservación de los mismos (estabilidad/viabilidad) e incluso la búsqueda de regulaciones específicas para productos basados en fagos ya que su farmacodinámica es completamente distinta a la de cualquier otro fármaco (Fischetti, 2006; Fischetti *et al.*, 2006; García y López, 2002; Matthey y Spencer, 2008; Parisien *et al.*, 2008; Skurnik y Strauch, 2006).

El término “enzibiótico” fue acuñado hace algo más de 10 años como la fusión de “enzima” y “antibiótico” (Nelson *et al.*, 2001). Este concepto incluía inicialmente las endolisinas codificadas por bacteriófagos que mostraban una elevada capacidad de degradar la pared celular y con alto potencial antibacteriano, pero hoy en día se ha ampliado a toda clase de enzimas que, independientemente de su origen, presenten actividad antibacteriana y/o antifúngica, péptidos antimicrobianos e incluso enzimas que bloquean la síntesis del peptidoglicano (Biziulevicius *et al.*, 2008). En los últimos años, numerosas proteínas pertenecientes a estos grupos han sido objeto de estudio como posibles candidatos a enzibióticos (Donovan y Foster-Frey, 2008; Fischetti, 2006; Hermoso *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2009).

Respecto a las endolisinas capaces de degradar la pared de neumococo, se ha demostrado que tanto las enzimas fágicas Cpl-1 y Pal como la autolisina bacteriana LytA pueden actuar como antibacterianos eficaces y específicos en el tratamiento de las infecciones causadas por neumococo, en modelos animales de infección (Jado *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2001; Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007). Además, Cpl-1 y Pal actuaban sinérgicamente entre ellas y, en el caso de Cpl-1, la sinergia también se consigue con antibióticos clásicos como la penicilina, moxifloxacino, gentamicina o la daptomicina (Djurkovic *et al.*, 2005; Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007; Vouillamoz *et al.*, 2013).

Los experimentos realizados con estos enzibióticos sólo han conseguido, hasta ahora, resultados positivos en bacterias Gram-positivas debido, probablemente, a que las Gram-negativas poseen una membrana externa que dificulta el acceso de estas enzimas a su diana (Kropinski, 2006; Skurnik y Strauch, 2006). No obstante, se ha descrito recientemente un ejemplo en el que se ha combinado la lisina con un transportador de membrana externa para solventar el inconveniente del acceso al peptidoglicano (Lukacik *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta todas estas características, es previsible que el estudio de los enzibióticos cobre mayor interés cada día, ya que estos compuestos ofrecen grandes posibilidades en la lucha contra las infecciones bacterianas, especialmente las provocadas por cepas multirresistentes.

5. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

En la investigación de las enfermedades infecciosas y su tratamiento es indispensable la validación de los resultados obtenidos en condiciones *in vitro* mediante el uso de modelos animales de experimentación. Gracias a estos modelos se han podido evaluar los diferentes mecanismos implicados en patogénesis, determinando la eficacia de nuevos compuestos antimicrobianos o caracterizando posibles dianas candidatas a vacunas (Chiavolini *et al.*, 2008). La elección tanto del modelo animal como de la cepa bacteriana debería ser considerada de forma muy cuidadosa ya que hay distintos componentes que pueden afectar a los resultados.

En la actualidad existen diferentes modelos para analizar las enfermedades causadas por las bacterias del género *Streptococcus*, desde los más sencillos como el uso de invertebrados *Caenorhabditis elegans* (Jansen *et al.*, 2002) o *Galleria mellonella* (Evans y Rozen, 2012), hasta el pez cebra (*Danio rerio*) del que se han documentado recientemente numerosos estudios tanto en el animal adulto como en embriones (Rounioja *et al.*, 2012). No obstante, el modelo de ratón ha sido tradicionalmente el más usado para el caso de estreptococos (Chiavolini *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2010; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

Las cepas consanguíneas (*inbred*) de ratas y ratones dan lugar a respuestas más uniformes a los tratamientos experimentales debido a que presentan un sistema inmune más homogéneo. Por esta razón, estos ratones han sido ampliamente empleados como modelos de infección, vacunación y estudios de eficacia de nuevos compuestos. Entre ellas se incluyen las cepas de ratones BALB/c, C57BL/6, DBA, y CBA. Sin embargo, las cepas no consanguíneas o “*outbred*” dan lugar a la máxima heterogeneidad. Esta diversidad fenotípica puede ser de gran importancia a la hora de imitar la variabilidad natural en respuesta a la infección y, por ello, se utilizan frecuentemente en modelos de patogénesis. En este grupo se incluyen las especies de ratas Wistar y Sprague-Dawley, así como los ratones CD-1 o Swiss. El conejo blanco (New Zealand) es la cepa de conejo más usada para inducir ENI. Finalmente, las chinchillas, jerbos y cobayas, son comúnmente utilizados como modelos de experimentación en estudios de otitis media.

Al igual que ocurre con el hospedador y dependiendo de la cepa de neumococo utilizada, existe una gran variabilidad en la infección causada por *S. pneumoniae* en los modelos experimentales. Entre las cepas de neumococo más utilizadas en modelos de patogenicidad en todo el mundo destacan las cepas D39, serotipo 2 (Lanie *et al.*, 2007) y la cepa TIGR4 de serotipo 4 (Tettelin *et al.*, 2002). La virulencia de neumococo, tanto en seres humanos como en ratones, se ve afectada por el serotipo capsular. En general, los serotipos de neumococo asociados a resistencia antibiótica suelen ser mucho menos virulentos, en modelos animales, que los serotipos sensibles (Briles *et al.*, 1992). Así, los neumococos de los serotipos 2, 3, 4, 5 y 6 suelen ser virulentos en ratones, mientras que los de serotipos 9V, 14, 19 y 23 son relativamente avirulentos (Benton *et al.*, 1997).

Muy recientemente, se ha comenzado a utilizar voluntarios sanos en estudios de portadores por neumococo (Ferreira *et al.*, 2011; Gladstone *et al.*, 2015; Gritzfeld *et al.*, 2013). Estos estudios pueden ser muy interesantes en un futuro pues suponen una fase intermedia entre la utilización de modelos animales y los ensayos clínicos.

II. OBJETIVOS

S. pneumoniae es uno de los principales patógenos causantes de enfermedad invasiva en todo el mundo y, además, coloniza la nasofaringe humana de forma habitual siendo un requisito esencial para el proceso de patogénesis del microorganismo. En la actualidad existen dos tipos de vacunas frente a neumococo que están compuestas por diferentes polisacáridos capsulares conjugados o no a una proteína transportadora y cuyo principal inconveniente es que protegen frente a un número muy limitado de serotipos. Es por ello, por lo que la identificación y caracterización de proteínas de neumococo como posibles candidatas a vacuna es una estrategia profiláctica que puede suponer un gran avance en la lucha contra la infección neumocócica.

Por otro lado, la aparición de aislados clínicos de neumococo con elevadas tasas de resistencia antibiótica puede poner en peligro el tratamiento con los antibióticos utilizados actualmente, lo que supone un importante riesgo en términos de salud pública. En este sentido, el estudio de nuevas propuestas terapéuticas para erradicar la colonización del tracto respiratorio, que es un proceso clave en el posterior desarrollo de enfermedad neumocócica invasiva, podría convertirse en una estrategia terapéutica muy novedosa frente a las infecciones producidas por *S. pneumoniae*.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos que nos planteamos en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1. Caracterizar la actividad inmunogénica de la proteína LytB como posible antígeno vacunal.**
- 2. Estudiar la actividad protectora de los anticuerpos generados frente a la proteína LytB en modelos murinos de neumonía y sepsis neumocócica.**
- 3. Determinar la capacidad de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 para erradicar la colonización de neumococo del tracto respiratorio superior e inferior, así como el estado de portador.**
- 4. Investigar el efecto sinérgico de la combinación de Cpl-1 y cefotaxima frente a la sepsis neumocócica en un modelo experimental murino.**

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Estirpes bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos y anticuerpos

Además de *Escherichia coli* RB791 BL21 (DE3), las estirpes bacterianas, los plásmidos, los oligonucleótidos y anticuerpos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral están detallados en las Tablas 2 a 6.

Tabla 2. Estirpes de *S. pneumoniae* utilizados en esta Tesis Doctoral

ND: No determinado

Cepa	Descripción	Secuencia tipo	Referencia/Origen
D48	Serotipo 23F	ST 321	(Soriano <i>et al.</i> , 2008)
69	Serotipo 19F	ST 236	(Soriano <i>et al.</i> , 2008)
957	Serotipo 3	ST ND	LRN. CNM. ISCIII.
3498	Serotipo 8	ST 63	Domenech A AAC 2014
M32	Δ lytA32 VTSP (NE)		(Moscoso <i>et al.</i> , 2010)

NE: No encapsulado debido a una delección parcial en el locus capsular

Tabla 3. Plásmidos y características de las proteínas y enzimas líticas

Proteína o enzima lítica	Vector	Cepa	Inducción	pH	kDa	Coeficiente Extinción Molar $M^{-1}cm^{-1}$	Referencia/Origen
LytB	pRGR5 (pT7.7) Amp ^R	BL21 (DE3)	D.O ₆₀₀ =0,8 IPTG 100μM - O/N	6,9	79,31	304360	(De las Rivas <i>et al.</i> , 2002)
Cpl-1	PCIP100 (PIN-III-A3) Amp ^R	RB791	D.O ₆₀₀ =0,6 20gr/l lactosa/ 37°C /18h	6,0	39,19	119875	(Sanz y García, 1990)
Cpl-7S	pTRD750 (pT7.7) Amp ^R	BL21 (DE3)	D.O ₆₀₀ =0,6 IPTG 0,1mM/ 30°C O/N	6,0	38,58	68425	(Díez-Martínez <i>et al.</i> , 2013)
Cpl-711	pTRD762 (pT7.7) Amp ^R	BL21 (DE3)	D.O ₆₀₀ =0,6 IPTG 0,1Mm RT O/N	6,0	39,11	126865	(Díez-Martínez <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 4. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5' → 3'
LytB-up	GAATGGGTAGAAGACAAGGGAGC
LytB-dn	CCTTATCTAGCCATACGACACTACCTT
<i>MLST - Multi Locus Sequence Typing</i>	
Aroe-up	GCCTTTGAGGCGACAGC
Aroe-dn	TGCAGTTCAGAAAACATATTTCTAA
Gdh-up	ATGGACAAACCACGATCAGCTTT
Gdh-dn	GCTTGAGGTCCCATGACTGATCCC
Gki-up	GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC
Gki-dn	TCTCCCGCAGCTGACAC
Recp-up	GCCAACTCAGGTCATCCAGG
Recp-dn	TGCAACCGTAGCATTGTAAC
Spi-up	TTATTCCTCCTGATTCTGTC
Spi-dn	GTGATTGGCCAGAAGCGGAA
pt-up	TTATTAGAAGAGCGCATCCT
Xpt-dn	AGATCTGCCTCCTTAAATAC
Ddl-up	TGCCTCAAGTTCCTTATGTGG
Ddl-dn	CACTGGGTGAAAACCATGGC AT

Tabla 5. Anticuerpos utilizados y otros reactivos

Compuesto	Descripción	Excitación/ Emisión (nm)	Origen
IgG total HRP	Anti-Ratón IgG (H+L) conjugado con HRP (Cabra)		Southern Biotech
IgA HRP	Anti-Ratón IgG (H+L) conjugado con HRP (Cabra)		Southern Biotech
IgG1 HRP	Anti-Ratón IgG1 (γ_1 cadena específica) conjugado con HRP (Cabra)		Southern Biotech
IgG2a HRP	Anti-Ratón IgG2a (γ_{2a} cadena específica) conjugado con HRP (Cabra)		Southern Biotech
IgG2b HRP	Anti-Ratón IgG2b (γ_{2b} cadena específica) conjugado con HRP (Cabra)		Southern Biotech
IgG3 HRP	Anti-Ratón IgG3 (γ_3 cadena específica) conjugado con HRP (Cabra)		Southern Biotech
C3b-FITC	Anti-C3b ratón conjugado con FITC (cabra)	495/519	Cappel (MP Biomedicals)
FAM-SE	5,6-carboxifluoresceína, succidinimil éster		rellenar
Hoechst 33342	Colorante fluorescente de ADN	350/461	AnaSpec
Rodamina/Faloidina	Colorante de actina-F	554/573	Invitrogen
C1q	Anti-C1q ratón (conejo)		Abcam
Anticuerpo secundario A	Anti ratón IgG conjugado con FITC (conejo)		Southern Biotech

1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. pneumoniae* se multiplicaron en medio Todd-Hewitt (Oxoid, Inglaterra) conteniendo extracto de levadura al 0.5% (THY) y suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) o en placas de agar Mueller Hinton enriquecido con 5% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid). Para el cultivo de las cepas de *S. pneumoniae* (extracción de ADN) se utilizó rutinariamente el medio C ajustado a pH 8.0 (CpH8) (Lacks y Hotchkiss, 1960) suplementado o no con extracto de levadura (Difco) al 0.08% (C+Y). Las cepas se conservaron congeladas a -80°C en los diferentes medios de cultivo empleados, a los que se añadió glicerol al 10% (v/v) (concentración final). A menos que se indique lo contrario, en el momento de sembrarlos, los cultivos bacterianos se descongelaron e incubaron en los medios correspondientes a 37°C sin agitación. La multiplicación de los cultivos de neumococo se siguió por turbidimetría a 550 nm (A550) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20. Los cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) se sembraron en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), añadiendo agar al 1.5% (p/v) para

cultivos en medio sólido. La concentración de antibiótico añadida al medio LB para el cultivo de cepas resistentes fue de 100 µg ml⁻¹ para ampicilina (Amp). El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría a 600 nm (A600) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20.

1.3. Reactivos y productos

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales Difco, Oxoid, Pronadisa, Sigma-Aldrich, Merck y Becton Dickinson. La agarosa fue suministrada por Pronadisa. Se emplearon la seroalbúmina bovina (BSA) que se preparó al 10% en agua a pH 7.5. Los antibióticos (de las CMI y la AMP) así como los compuestos, *o*-fenildiamina, paraformaldehído, (PFA) y azul tripán fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Los medios utilizados para los cultivos celulares fueron RPMI 1640 con o sin rojo fenol (Invitrogen), glutamina (Invitrogen), penicilina-estreptomicina (Invitrogen) y HBSS (Invitrogen) con o sin Ca²⁺ y Mg²⁺.

1.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislados clínicos se llevó a cabo por la técnica de dilución en agar (Fenoll *et al.*, 1991), de acuerdo con los criterios del Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico (CLSI). Los estudios de susceptibilidad antibiótica fueron repetidos un mínimo de tres veces para cada cepa. Los aislados clínicos de *S. pneumoniae* utilizados en esta Tesis Doctoral incluyeron, tal como muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. CMIs (µg ml⁻¹) de cada una las cepas para los diferentes antibióticos.

Antibiótico/ Enzimas	Cepas (serotipo)			
	48 (23F)	69 (19F)	957 (3)	3498 (8)
Amoxicilina (AMX)	16 µg ml ⁻¹	2 µg ml ⁻¹	0,015 µg ml ⁻¹	0,06 µg ml ⁻¹
Cefotaxima (CTX)	8 µg ml ⁻¹	2 µg ml ⁻¹	0,015 µg ml ⁻¹	0,03 µg ml ⁻¹
Cloranfenicol (CHL)	4 µg ml ⁻¹	4 µg ml ⁻¹	4 µg ml ⁻¹	4 µg ml ⁻¹
Eritromicina (ERY)	> 128 µg ml ⁻¹	4 µg ml ⁻¹	0,25 µg ml ⁻¹	> 128 µg ml ⁻¹
Levofloxacino (LVX)	1 µg ml ⁻¹	1 µg ml ⁻¹	1 µg ml ⁻¹	32 µg ml ⁻¹
Tetraciclina (TET)	64 µg ml ⁻¹	16 µg ml ⁻¹	0,5 µg ml ⁻¹	64 µg ml ⁻¹

2. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

2.1. Producción y purificación de proteínas

Para la purificación de la proteína LytB y las lisozimas Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 se siguió los protocolos previamente descritos (Bustamante *et al.*, 2010; de las Rivas *et al.*, 2001, 2002;

Díez-Martínez *et al.*, 2013; Díez-Martínez *et al.*, 2015) con algunas modificaciones. Se partió de un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) o RB791 conteniendo los plásmidos pCIP100, pTRD750 o pTRD762 (Tabla 3) y se incubó en medio LB con Amp ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) en agitación a 37°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} \approx 0,8$ (LytB) y $0,6$ (Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711). En ese momento se añadió la concentración de IPTG correspondiente para la inducción (Tabla 3). La incubación se siguió, en agitación, tiempo y temperatura de acuerdo con cada proteína para evitar en lo posible la aparición de cuerpos de inclusión (Tabla 3). Posteriormente, el cultivo se mantuvo en hielo durante 15 min y las células se recogieron por centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 min a 4°C , y se lavaron, repitiendo la centrifugación, con tampón fosfato sódico 20 mM, al pH correspondiente (Tabla 3) (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992). La lisis celular se realizó pasando la suspensión por una prensa de “French-Press” a una presión de 8.3 MPa y se descartaron los restos celulares con una centrifugación a $13\ 000 \times g$ durante 20 min a 4°C . Los restos de DNA del sobrenadante se precipitaron añadiendo sulfato de estreptomina (0.6 mg/ml proteína total). Tras incubar la mezcla durante 20 min a 4°C con agitación suave, se separó el precipitado por centrifugación a $13000 \times g$ durante 20 min a 4°C . La fracción soluble obtenida se mantuvo en hielo.

Para la purificación de LytB en DEAE-celulosa, la proteína retenida en la columna se eluyó con tampón fosfato 20 mM pH 6,9 que contenía NaCl 1,5 M y cloruro de colina 2%. Las diferentes fracciones obtenidas fueron medidas en el espectrofotómetro a 280 nm y aquellas en las que se detectó proteína fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Finalmente, las fracciones escogidas fueron dializadas en tampón fosfato 20 mM pH 6,9 con el fin de eliminar el exceso de NaCl y colina. Para la purificación de las enzimas Cpl-1 y Cpl-711 se siguió la misma metodología descrita anteriormente para este tipo de proteínas, basada en la purificación en un solo paso mediante una columna de DEAE-celulosa, que se comporta como cromatografía de afinidad (Sanz y García, 1990). Para la purificación de la quimera Cpl-7S (una variante sintética de Cpl-7), se siguió el mismo protocolo descrito (Bustamante *et al.*, 2010; Díez-Martínez *et al.*, 2015) pero con algunas modificaciones. En este caso, para la lisozima Cpl-7S se añadió una solución saturada de sulfato amónico preparada en tampón fosfato sódico 20 mM a pH 7.0. Las proteínas precipitadas entre el 20 y el 35% (p/v) de saturación se dializaron y se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico, en una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón sódico 20 mM a pH 6.0. A continuación, se pasaron concentraciones crecientes de NaCl de 0.3 a 0.5 M y la Cpl-7S obtenida se eluyó a una concentración de NaCl de 0.46 M de sal. Por último, se realizó un paso adicional de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular (FPLC-AKTA) utilizando una columna SuperosaTM12 o Superdex200 (16/60) en función del volumen y la concentración de la muestra a purificar.

2.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas del estudio se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. La medida de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies[®]) utilizando como blanco la misma solución en la que estaban disueltas las proteínas. El grado de pureza de las muestras se determinó mediante el cociente de extinción A_{280}/A_{290} .

2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (100 × 75 × 1 mm) a una concentración de 10, 12.5 o 15%, según los experimentos. Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8; SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 50 mA (corriente constante), utilizando un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular se adquirieron de Bio-Rad: miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa) e inhibidor de tripsina (21.5 kDa).

2.4. Tinción de proteínas con azul de Coomassie coloidal

Las proteínas se visualizaron mediante tinción de los geles con azul de Coomassie brillante R-250 (Bio-Rad®) al 0.25% (p/v), en metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 10 min. Los geles se destiñeron en una solución de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agitación, hasta que las bandas resultaron claramente visibles (Swank y Munkres, 1971).

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Preparación de DNA cromosómico

El DNA cromosómico de *S. pneumoniae* se preparó utilizando un procedimiento descrito previamente (Fenoll et al., 1994). Para ello, las células de un cultivo en C+Y ($DO_{550} = 0.6-0.7$) (10 ml) se sedimentaron por centrifugación a $10000 \times g$, utilizando un rotor SS-34 durante 5 min a 4°C. El sedimento del cultivo se resuspendió en 0.4 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM EDTA, 0.4% Sarkosyl y 0.1% Tritón X-100) (Morrison et al., 1978), y se incubó a 37°C hasta la lisis del cultivo. A los cultivos lisados se les añadió RNasa (100 mg ml⁻¹) y se incubaron durante 1 h a 37°C y, posteriormente se añadió proteinasa K (100–200 g ml⁻¹) continuándose la incubación durante 1 h a 37°C. Las proteínas restantes se eliminaron mediante un tratamiento con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 5 min. Para precipitar el DNA, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se añadieron 0.1 volúmenes de 3 M acetato potásico, pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo durante 20 min a -20°C y se sedimentó por centrifugación a $12000 \times g$ durante 20 min a 4°C. Para eliminar las sales que podrían haber co-precipitado con el DNA, se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 4°C, 10 min. El DNA 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).

3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 0.7 o 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 compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v), xilencianol al 0.2% y EDTA 40 mM (pH 8.0). La electroforesis se realizó a 100–150 V durante 60-90 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) o GelRed (Biotium) y los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron, según los casos, el ADN del fago λ digerido con BstEII (Amersham) la forma replicativa del ADN del fago λ X174 digerido con HaeIII y el ADN monocatenario de M13mp18, así como los marcadores de 1 kb y de 100 pb en escalera de New England Biolabs.

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del gen *lytB*

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN del gen *lytB* se empleó un equipo Mastercycler gradient de Eppendorf y la enzima Phusion[®] (Biolabs[®]) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los productos amplificados fueron llevados a cabo por la empresa Secugen.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE *LytB* DE *S. pneumoniae*

4.1. Obtención de sueros inmunes frente a la proteína *LytB* de neumococo para estudiar la respuesta inmunológica

Los ensayos de inmunización consistieron en la utilización de grupos de 5 ratones hembras BALB/C (6-8 semanas de edad), inmunizados de forma independiente, por vía intraperitoneal (ip), con 10 μg de la proteína *LytB* purificada. Esta proteína se mezcló previamente en proporción 1:1 con Alhydrogel[®] (Alum) compuesto por hidróxido de aluminio, (Invivo Gen; Vacci Grat[™]) como adyuvante diluido al 2% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se incluyó un grupo control de ratones que fue inmunizado únicamente con el adyuvante en ausencia de *LytB*. Todas las inmunizaciones se realizaron en los días 0, 7 y 14. A los 21 post-inmunización se procedió a sacrificar a los animales con una dosis letal de pentobarbital[®] por vía intraperitoneal (7 mg/ratón), obteniendo la sangre de los animales mediante punción cardíaca. La sangre se mantuvo durante 2 h a 4°C para, después, centrifugarla a $5000 \times g$ durante 10 min con el fin de separar el suero. El suero obtenido se conservó en alícuotas que se congelaron a -80°C para su utilización posterior en diferentes ensayos *in vitro*.

4.2. Determinación de los niveles de Inmunoglobulinas G y subclases en el suero de los animales inmunizados frente la proteína *LytB*

La cuantificación de los niveles de anticuerpos específicos de los sueros procedentes de ratones inmunizados con Alhydrogel[®] en presencia o no de la proteína *LytB* se midió mediante ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), usando placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp Nunc[®]). Para tapizar la placa se utilizaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína *LytB*. Las

placas se incubaron a 37°C durante 2 horas y se bloquearon con una solución de PBS que contenía 2% de BSA (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). El exceso de solución bloqueante se eliminó mediante 3 lavados con PBS-Tween al 0.1%, incubando las placas multipocillos durante 2 h con los correspondientes sueros de los animales inmunizados. Como controles negativos, se incluyeron un grupo control utilizando sueros procedentes de ratones inmunizados solamente con Alum, y otro con suero procedente de animales no inmunizados con la proteína del estudio ni tampoco con Alum (control de suero no inmune; SNI). Todos los sueros se prepararon a partir de una dilución 1:10 en PBS realizando sucesivas diluciones seriadas 1/2 en PBS. A continuación, las placas multipocillo se lavaron con PBS-Tween al 0.1% y los diferentes pocillos se incubaron con el correspondiente anticuerpo conjugado con peroxidasa durante 45 min a 37°C que reconoce IgG total o determinadas subclases de IgG. Se realizaron lavados con PBS-Tween al 0.1% para retirar el exceso de anticuerpo conjugado y la detección de la señal se reveló utilizando el compuesto *o*-fenildiamina (Sigma®) (1 mg/ml) en solución de citrato/fosfato. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas (Anthos 2020) a 492 nm. La técnica de ELISA se realizó siempre por duplicado y los experimentos se repitieron, a las menos, tres veces.

5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

5.1. Activación de la vía clásica del complemento

La capacidad inmunogénica de los anticuerpos originados tras la inmunización con la proteína LytB, se analizó mediante citómetro de flujo. En primer lugar, se determinó la activación de la vía clásica del complemento midiendo el primer componente C1q (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Para ello, se incubaron 10 µl de una suspensión bacteriana que contenía 5×10^6 UFC con 10 µl de cada uno de los sueros descritos anteriormente diluidos al 50% en PBS durante 20 min a 37°C. Como controles negativos se utilizó PBS (control sin suero) así como suero procedente de ratones inmunizados únicamente con Alum diluido también al 50% en PBS. Se realizaron 2 lavados con 200 µl de PBS-Tween-20 (0.1%) para eliminar el componente C1q no unido a las bacterias y con el fin de detectar la unión al componente C1q se incubaron las bacterias con 10 µl de anticuerpo policlonal de conejo anti C1q de ratón diluido 1/100 en PBS-Tween-20 (0.1%) durante 2 h a 37°C. Tras dos lavados con PBS-Tween-20 (0.1%), se añadieron 50 µl de anticuerpo secundario de conejo anti-IgG ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (diluido 1/300 y se incubó durante 1 h en hielo y oscuridad. Como en los pasos anteriores, se realizaron dos lavados con 200 µl de PBS-Tween-20 (0.1%) con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no unido y, finalmente, se añadieron 50 µl de paraformaldehído (PFA) (Merck) al 3% en PBS. Se completó el volumen de todas las muestras hasta 250 µl con PBS para su posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS Calibur (BD Bioscience) ajustando la concentración bacteriana en función de los parámetros tamaño y complejidad y adquiriendo, al menos, 25000 bacterias para su estudio (Brown *et al.*, 2002a; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Los ensayos se repitieron al menos tres veces y los resultados se expresaron como índice relativo de fluorescencia (IRF) en el que se analizó la proporción de bacteria positiva para la molécula estudiada y la intensidad de fluorescencia que permite determinar cuántas moléculas se unen por bacteria (Exley *et al.*,

2005). El IRF se define como la proporción de células positivas para neumococo multiplicado por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (Yuste *et al.*, 2005).

5.2. Reconocimiento por el componente C3b del complemento

La unión de neumococo al componente C3b del complemento se determinó mediante citometría de flujo siguiendo un protocolo similar al descrito anteriormente para el componente C1q. El proceso de opsonización consistió en incubar 10 μl de una suspensión bacteriana en PBS conteniendo 5×10^6 UFC con 10 μl de suero de ratón, diluido al 50% en PBS durante 20 min a 37°C. Los controles negativos fueron los mismos que en el componente C1q incluyendo la incubación en PBS, así como en suero de animales inmunizados sólo con Alum. El componente C3b no unido se eliminó mediante dos lavados con PBS-Tween-20 (0.1%). Para detectar la unión de C3b a la superficie bacteriana, se añadieron 50 μl de anticuerpo policlonal de cabra anti-C3b de ratón conjugado con FITC (Cappel - MP Biomedicals[®]) diluido 1/300 en PBS-Tween-20 (0.1%) incubando durante 30 min en hielo y oscuridad. Se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de anticuerpo no unido y, finalmente, se añadieron 50 μl de PFA al 3% a temperatura ambiente para fijar la bacteria. Los ensayos se repitieron al menos tres veces y los resultados se expresaron como índice relativo de fluorescencia (IRF), explicado anteriormente.

6. OPSONOFAGOCITOSIS

6.1. Marcaje de *S. pneumoniae* con FAM-SE

Con el fin de realizar estudios de opsonofagocitosis, se marcaron las bacterias con el fluorocromo 5,6-carboxifluoresceína, succidinimil éster (FAM-SE) (Molecular Probes) (Romero-Steiner *et al.*, 1997). En primer lugar, las cepas se incubaron en medio THY a 37°C hasta una DO_{550} de 0.6-0.7. A continuación, las bacterias se lavaron con tampón de bicarbonato sódico (0.1 M, pH 8.0), se añadieron 50 μl de FAM-SE (10 mg ml^{-1} en dimetilsulfóxido) en tampón de bicarbonato sódico durante 1 h a 37°C y, posteriormente, se lavaron seis veces con HBSS comercial que contiene calcio y magnesio. Los viales se conservaron a -80°C en medio THY al que se le añadió 10% de glicerol para su posterior utilización en los estudios de opsonofagocitosis.

6.2. Fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares

La fagocitosis mediada por neutrófilos se analizó mediante un ensayo de citometría de flujo, utilizando las cepas de *S. pneumoniae* marcadas con FAM-SE y la línea celular HL-60 (CCL-240; ATCC) diferenciada a granulocitos (Martinez *et al.*, 1999) .

Las células diferenciadas se lavaron dos veces con HBSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} pero suplementado con 0.2% de BSA) y un lavado adicional con HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} suplementado igualmente con 0.2% de BSA. Para realizar el recuento de células viables se utilizó un hematocitómetro y, mediante tinción con azul tripán (Sigma-Aldrich[®]), se visualizó la proporción de células viables realizándose el experimento sólo cuando la viabilidad celular era superior al 95%. Las células se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

Los experimentos de fagocitosis se realizaron utilizando placas multipocillo (Nunc®). En primer lugar, se incubaron 10^6 UFC de bacterias marcadas con FAM-SE en 10 μ l de suero inmune de ratón diluido 1/20 durante 20 min a 37°C y con agitación (150 \times g). A continuación, se añadieron 10^5 células HL-60 diferenciadas incubándose durante 30 min a 37°C en agitación. Finalmente, se añadieron 50 μ l de PFA al 3% para fijar las células e inactivar las bacterias y se completó el volumen con 100 μ l de HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Las muestras se transfirieron a tubos de citómetro y se guardaron en oscuridad hasta su análisis. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y, como controles negativos, se utilizaron bacterias incubadas en HBSS o en suero procedente de animales inmunizados sólo con adyuvante. Los resultados se expresaron como índice relativo de fluorescencia (IRF) de fagocitosis, que se define como la proporción de células positivas que contienen bacteria fluorescente multiplicada por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (Yuste *et al.*, 2010b).

7. CARACTERIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE NEUMOCOCO EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A LytB

El aislado clínico de *S. pneumoniae* 48 de serotipo 23F y la cepa mutante de *S. pneumoniae* M32 Δ *lytA* se incubaron hasta una $DO_{550} = 0.4/0.5$. Las suspensiones bacterianas (diluidas 1/100) se distribuyeron en placas multipocillo incubándose durante 4 h a 37°C con diferentes sueros de ratones de la estirpe BALB/C (diluidos 1/200). Los sueros que se probaron fueron suero normal de ratones (SNR), suero de ratones inmunizados con Alum, suero de ratones vacunados con Alum en presencia de 20 μ g de LytB y suero de conejo inmunizado con LytB (De las Rivas *et al.*, 2002). Las muestras se analizaron utilizando un microscopio de contraste de fases de Leica®.

8. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

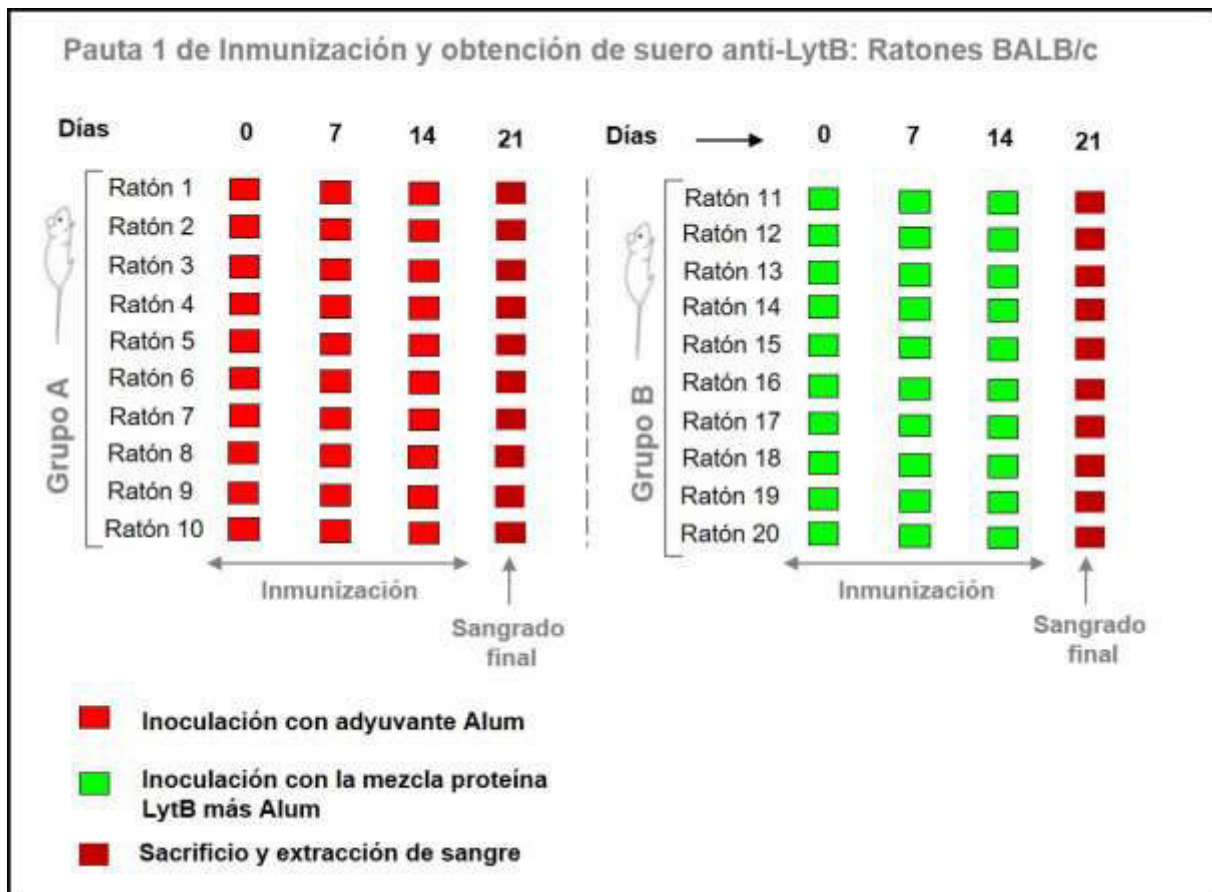
Todos los experimentos con animales contemplados en esta Tesis Doctoral cumplieron con la normativa vigente sobre manejo y cuidado de animales en materia de experimentación y bienestar animal según la legislación española (RD 53/2013 y RD 1201/2005) así como las regulaciones correspondientes de la Unión Europea (218/63/UE). Los experimentos en animales realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de ética de la investigación y de bienestar animal del ISCIII (CBA PA 52_2011-v2), por el Órgano encargado del bienestar animal del ISCIII (M-03-2015), así como por la Consejería de Medio Ambiente, administración local y ordenación del territorio de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 218/15). Los animales utilizados en esta Tesis Doctoral fueran criados en el animalario del ISCIII. Para los experimentos de colonización de nasofaringe por neumococo se utilizaron ratones C57BL/6 machos o hembras indistintamente de unas 8-12 semanas de edad. Los experimentos de neumonía y sepsis neumocócica se realizaron utilizando ratones hembras BALB/C de unas 8-12 semanas de edad,

8.1. Determinación de la mínima dosis letal

Para determinar la mínima dosis letal (MDL), se inocularon grupos de 5 ratones BALB/C o C57BL/6 con una suspensión bacteriana en PBS o THY utilizando 50 μ l para la vía intranasal (in) bajo anestesia con isoflurano ó 200 μ l para la vía ip. Se probaron diferentes concentraciones bacterianas de los diferentes aislados clínicos descritos en la Tabla 2 para conocer la MDL de cada aislado clínico. Se utilizó PBS o THY como vehículo del inóculo en función de la virulencia del microorganismo ya que la presencia de THY favorece la virulencia en las cepas de neumococo que son poco invasivas en modelos animales. Se determinó la MDL que producía el 100% de mortalidad en un período de 7 días de seguimiento.

8.2. Pauta de inmunización para la obtención de suero con anticuerpos frente a LytB

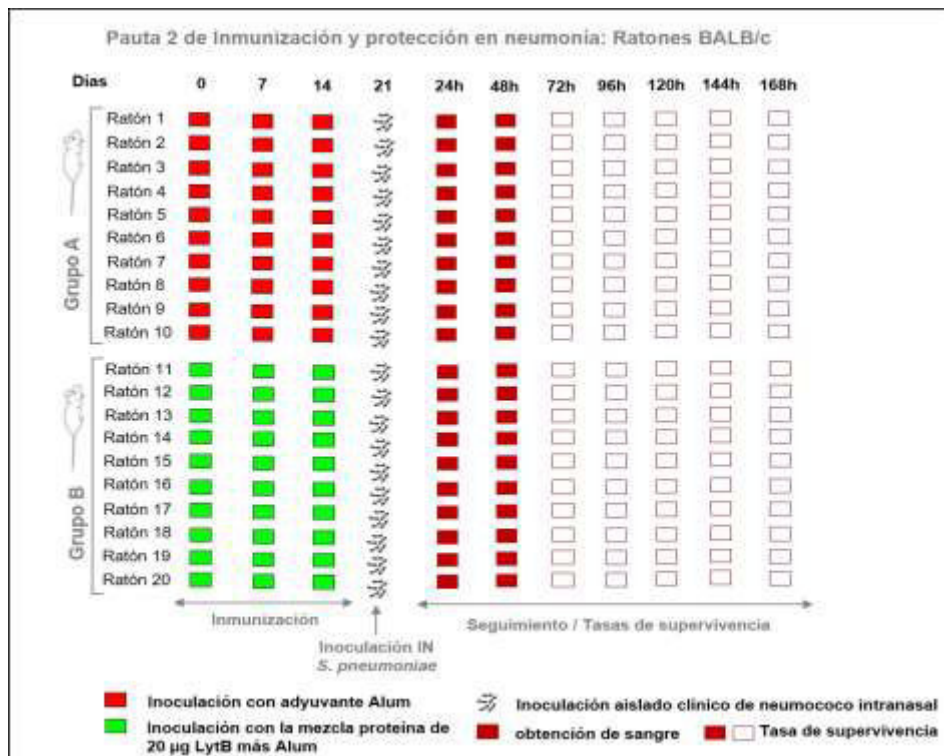
Los ensayos de inmunización consistieron en la utilización de grupos de 10 ratones hembras BALB/C (6-8 semanas de edad), inmunizados de forma independiente, por vía ip, con 20 μ g de la proteína LytB purificada mezcladas en proporción 1:1 con Alum como adyuvante diluido al 2% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se incluyó un grupo control de ratones que fue inmunizado únicamente con el adyuvante y un grupo de ratones inmunizados con una mezcla de adyuvante y la proteína LytB de neumococo. Todas las inmunizaciones se realizaron en los días 0, 7 y 14 (Pauta 1). La concentración de proteína utilizada como antígeno en las inmunizaciones se decidió en función de la protección conferida en los diferentes experimentos y según el aislado clínico estudiado (Plumptre *et al.*, 2013).



8.3. Modelos murinos de protección frente a la enfermedad neumocócica

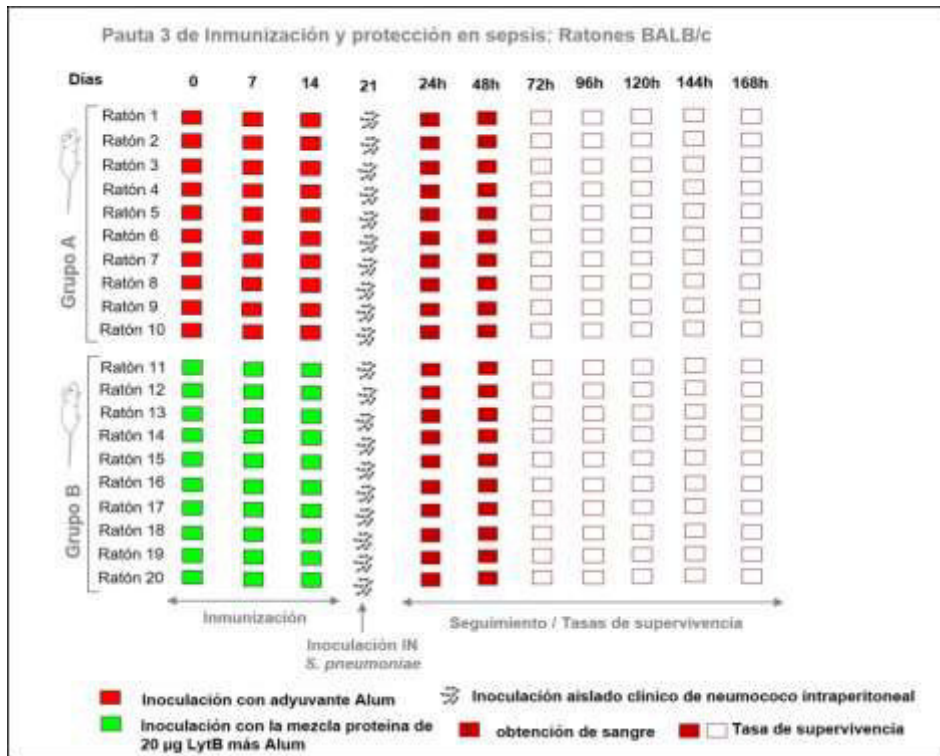
8.3.1. Modelo de protección en ratones frente a la neumonía neumocócica

Para el modelo de neumonía, grupos de 5 o 10 ratones fueron inmunizados por vía ip según el protocolo descrito anteriormente (apartado 8.2.) A los 21 días tras la primera inmunización los diferentes grupos inmunizados fueron inoculados por vía in, bajo anestesia con isoflurano con 50 μ l de la correspondiente MDL de los aislados clínicos estudiados. Los animales fueron observados diariamente anotando la muerte y supervivencia de los mismos, así como su estado de salud durante un período de 7 días (Pauta 2). Además, se determinaron los recuentos bacterianos a lo largo de los días a partir de una muestra de 6 μ l de sangre obtenida de la vena de la cola de los animales infectados. Se realizaron diluciones seriadas de las distintas muestras obtenidas y se sembraron en placas de agar sangre para determinar las bacterias viables. Los experimentos se repitieron al menos tres veces. El límite de detección más bajo fue de 10^2 UFC ml^{-1} .



8.3.2. Modelo de protección en ratones frente a la sepsis neumocócica

La capacidad protectora de las diferentes proteínas de neumococo como antígenos vacunales frente a la infección sistémica, se estudió en un modelo de sepsis neumocócica, utilizando grupos de entre 5-15 ratones de la estirpe BALB/C. Los animales fueron inmunizados conforme a la pauta de inmunización descrita en el apartado 8.2. A los 21 días post-inmunización, los distintos grupos inmunizados fueron inoculados por vía ip con 200 µl del correspondiente MDL de los aislados clínicos estudiados (Pauta 3). Las tasas de muerte y supervivencia, así como los recuentos de bacteria en sangre se determinaron a lo largo de 7 días siguiendo las directrices descritas en el apartado anterior.



9. FAGOTERAPIA

9.1. Capacidad de los enzibióticos para eliminar a los neumococos adheridos al tracto respiratorio

Para investigar el papel de los diferentes enzibióticos como posibles alternativas terapéuticas en la eliminación de los neumococos adheridos al tracto respiratorio, se realizaron estudios de adhesión utilizando líneas celulares epiteliales humanas. Para ello, se incluyeron la línea de epitelio de nasofaringe Detroit 562 (D562) (CCL138; ATCC) y la línea de epitelio pulmonar A549 (CCL-185, ATCC) (Morey *et al.*, 2011; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Las monocapas de células se crecieron en frascos de cultivos, hasta alcanzar el 90–95% de confluencia, utilizando medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 1% de glutamina y 1 mM de piruvato sódico (Hendriksen *et al.*, 2008). La noche anterior a realizar el experimento, las células se crecieron en placas de 24 pocillos (Falcon®) con una densidad de 10^5 células por pocillo. El día del experimento (ensayos de adhesión), las células se infectaron por triplicado con los aislados bacterianos en una proporción de 2×10^6 cfus y se incubaron a 37°C durante 1 h, en presencia de 5% de CO₂. Por último, los pocillos infectados se lavaron con PBS (pH 7.3). Para investigar la actividad terapéutica mediada por los enzibióticos del estudio, las células previamente infectadas durante 1 h se lavaron cinco veces con PBS para eliminar la bacteria no adherida y se incubaron durante una hora adicional en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía PBS para el grupo control (placebo) y diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µg/ml) de los enzibióticos Cpl-1, Cpl-7S o Cpl-711 y, además, se incluyó AMX para comparar la eficacia del tratamiento para poder comparar los resultados con un antibiótico de uso común como es la AMX. Finalmente, las células se lavaron cinco veces con PBS y se lisaron con 300 µl de una solución conteniendo 0,025% de saponina-PBS durante 10 min (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Para calcular la

proporción de bacterias recuperadas de las células infectadas, se llevó a cabo el correspondiente recuento de viables. Los experimentos se repitieron tres veces y los resultados se expresaron como la proporción de bacterias recuperadas de las células (D562 o A549) con los diferentes tratamientos en comparación con los grupos control de células infectadas pero tratadas con PBS como placebo.

9.1.1. Microscopía confocal

La microscopía láser confocal (CLSM) fue utilizada en esta tesis para observar la adhesión del neumococo en las células del epitelio de nasofaringe y pulmonar humano, así como el efecto terapéutico tras la administración de diferentes enzibióticos. Para ello, las monocapas de células se crecieron previamente en placas multipocillos que contenían cristales de 13 mm de diámetro (VWR international) con el fin de que las células se fijaran a los mismos durante al menos 18-24h. El día del experimento, los pocillos se infectaron y procesaron como se ha descrito en el apartado anterior, pero utilizando cepas fluorescentes de *S. pneumoniae* previamente marcadas con FAM-SE siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.1. Se analizó únicamente la concentración de 10 µg/ml de los enzibióticos Cpl-1, Cpl-7S o Cpl-711 utilizando PBS como placebo para el grupo control. Tras 1 h de tratamiento, los cristales que contenían las células infectadas se lavaron 3 veces con PBS, y se fijaron con 3% de PFA durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de una solución 1 M de NH₄Cl en PBS. Para la tinción del DNA celular, así como del citoesqueleto de actina, los cristales con las células infectadas, se lavaron dos veces con una solución de PBS-saponina al 0,1% seguido de un lavado con PBS. Los cristales se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad con la solución de marcaje celular que estaba compuesta por Hoechst (Invitrogen™) diluido 1/2500 para la tinción del ADN celular, así como de rodamina-faloidina (Invitrogen™) diluido 1:200 para la detección del citoesqueleto de actina. Por último, los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS que contenía 0,1% de saponina, una vez en PBS, y una vez en agua y se montaron con Aqua Poli/Mount (Polysciences®). Las muestras se analizaron con un microscopio confocal SP5 de Leica® utilizando el software (LAS-AF) (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015; Ramos-Sevillano *et al.*, 2016).

9.2. Capacidad de los enzibióticos para erradicar el estado de portador en un modelo murino de colonización de nasofaringe

Se determinó la posible actividad terapéutica de los diferentes enzibióticos en la erradicación del estado de portador inducido por neumococo. Se estableció un modelo murino de colonización de nasofaringe, utilizando el aislado clínico 48 (serotipo 23F), que es multirresistente y, por tanto, de gran interés desde el punto de vista terapéutico. Se utilizaron grupos de al menos cinco ratones, bajo anestesia con isofluorano, a los que se inoculó por vía intranasal una suspensión bacteriana con 10⁷ UFC (en un volumen de 10 µL) de este aislado de neumococo. El tratamiento se inició 40 h después de la inoculación bacteriana y consistió en la administración de 50 µl de una dosis de 10 µg/ratón por vía intranasal, administrando 50 µl de PBS como placebo al grupo control.

Además, se utilizó el aislado clínico 69 (serotipo 19F) que también es multirresistente. El procedimiento fue similar al descrito con el aislado 48. Se incluyó AMX (10 µg/ratón) como

control de antibiótico convencional y los tratamientos consistieron en la administración de una única dosis de 10 µg/ratón de los enzibióticos Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 y, además, por otro lado, también se analizó en paralelo la terapia con una dosis diaria durante tres días, administrando los compuestos a las 24h, 48h y 72h.

Los animales fueron sacrificados a las 5 h después del último tratamiento. Para determinar los niveles de bacteria en la nasofaringe, se recogió el líquido procedente del lavado nasofaríngeo, realizando diluciones seriadas de las distintas muestras obtenidas, y se sembraron en placas de agar-sangre para determinar las bacterias viables.

9.3. Combinación de enzibióticos y antibióticos de amplio espectro frente a la sepsis neumocócica en un modelo murino.

Se analizó la capacidad del enzibiótico Cpl-711 para proteger de forma sinérgica o aditiva frente a la sepsis neumocócica en presencia de cefotaxima (CTX) como antibiótico β-lactámico de amplio espectro. Para ello, grupos de 10 ratones hembras BALB/C fueron inoculados con la MDL del aislado clínico 48 (serotipo 23F) y una hora después, los animales fueron tratados por vía subcutánea con Cpl-711 (4 µg/ratón) o CTX (25 mg/kg), o bien con una solución que contenía Cpl-711 (4 µg/ratón) o CTX (25 mg/kg) de forma combinada. Al grupo control se le administró el mismo volumen por vía subcutánea, pero de PBS como placebo. Los animales fueron observados diariamente anotando la muerte y supervivencia de los animales, así como su estado de salud durante un período de 7 días. Además, se determinaron los recuentos bacterianos a lo largo de los días a partir de una muestra de 6 µl de sangre obtenida de la vena de la cola de los animales infectados. Se realizaron diluciones seriadas de las distintas muestras obtenidas y se sembraron en placas de agar sangre para determinar las bacterias viables. Los experimentos se repitieron al menos tres veces. El límite de detección más bajo fue de 10^2 UFC ml⁻¹.

IV. RESULTADOS

1. LA UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA LytB DE *Streptococcus pneumoniae* COMO POSIBLE ANTÍGENO VACUNAL FRENTE A LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA INVASIVA

La prevención de la ENI es una de las principales prioridades en salud pública debido a las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo (O'Brien *et al.*, 2009). Sin embargo, una de las mayores desventajas del uso de vacunas basadas en polisacáridos capsulares es la enorme variabilidad de la población neumocócica con hasta 96 serotipos diferentes descritos hasta la fecha (Park *et al.*, 2015). Si a esta limitación se le suma que el intercambio de cápsula conocido como “switching” capsular es un fenómeno que ha sido descrito tras la introducción de las actuales vacunas conjugadas, hace que nos encontremos ante una situación de elevado riesgo y preocupación ya que muchas de los aislados clínicos que estén emergiendo pueden evitar la inmunidad inducida por la vacuna debido a la adquisición de genes capsulares procedentes de serotipos que no están incluidos en la vacuna (Aguinagalde *et al.*, 2015; Brueggemann *et al.*, 2007; Golubchik *et al.*, 2012). Para evitar estos problemas, una posibilidad sería la caracterización de nuevas vacunas basadas en proteínas de neumococo que puedan proteger frente a diferentes serotipos. En este primer objetivo de Tesis Doctoral, se analizó la actividad inmunogénica de la proteína LytB como posible candidata a vacuna, así como su mecanismo de protección y su capacidad para conferir protección frente a la neumonía y sepsis neumocócica.

1.1. Cuantificación de inmunoglobulinas totales y subtipos en sueros de ratones BALB/c después de la inmunización con LytB

Se analizó mediante la técnica de ELISA la respuesta de IgG predominantes en sueros de ratones de la estirpe BALB/c después de la inmunización con el adyuvante Alum o con la proteína LytB en presencia de Alum. La cuantificación de las diferentes inmunoglobulinas se determinó en suero normal de ratones no inmunizados (SNR), suero de ratones inmunizados solamente con adyuvante (Alum) y suero de ratones inmunizados con la proteína LytB en presencia de Alum (LytB). Las inmunoglobulinas que se caracterizaron fueron las IgG totales, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA.

Los resultados de este estudio demostraron que los sueros de los ratones inmunizados con LytB tenían una elevada respuesta de IgG total en comparación a los sueros de ratones inmunizados con Alum y a los no inmunizados (Fig. 7). La vacunación con LytB indujo niveles constantes de IgG, predominantemente de las subclases IgG1 e IgG2b (Figs. 7B y 7D) seguidos de IgG2a e IgG3 (Figs. 7C y 7E). En general, estos resultados indican que la proteína LytB de neumococo es una proteína inmunogénica, capaz de conferir anticuerpos IgG de diferentes subclases y que, además, podrían ser funcionales a nivel de respuesta inmune protectora.

Por último, se midieron los niveles de IgA en el suero de los ratones vacunados por vía intraperitoneal con Alum o con LytB en presencia de Alum confirmando la presencia de una ligera respuesta de IgA a nivel sistémico (Fig. 7F).

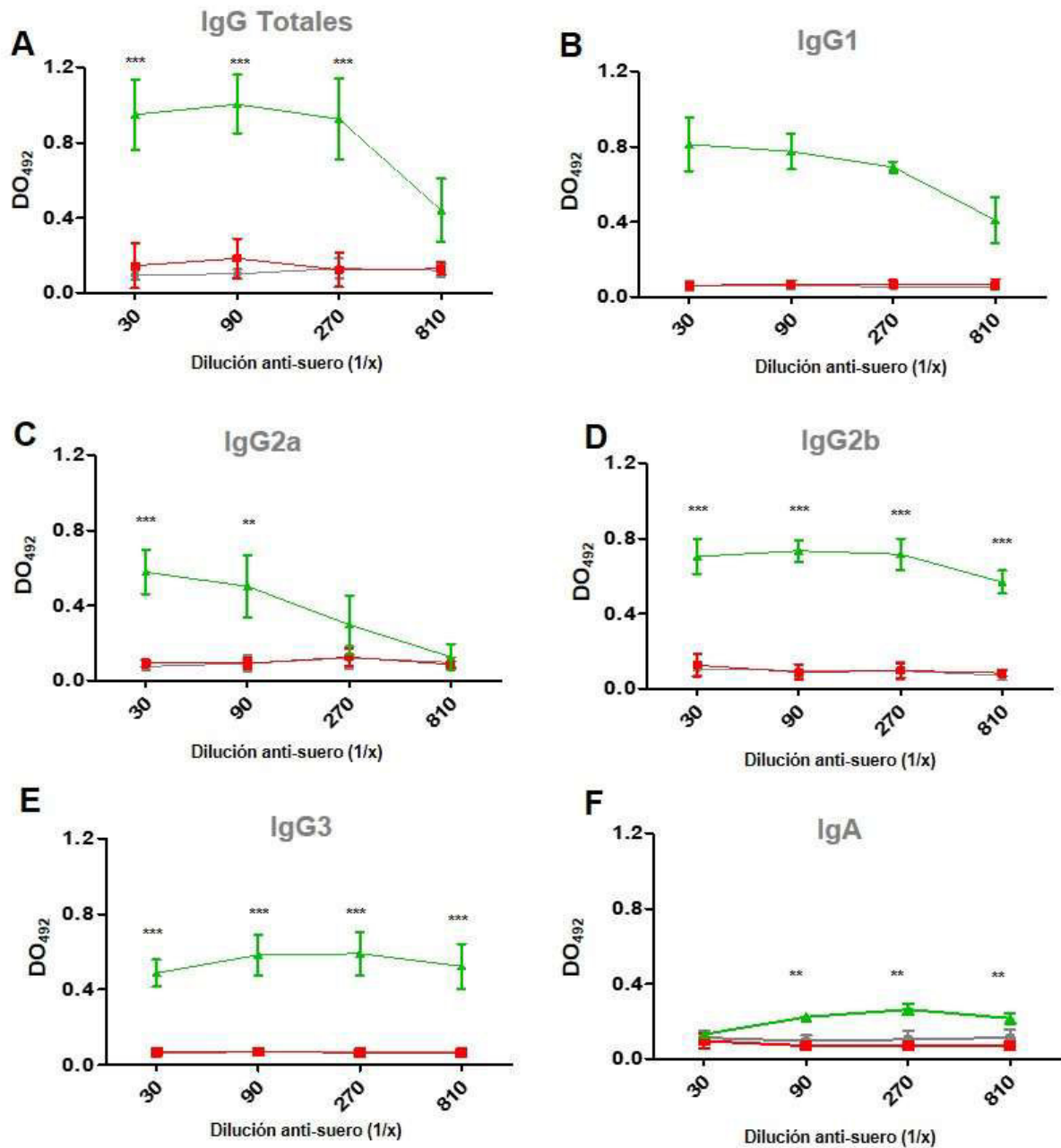


Fig. 7. Titulación de anticuerpos utilizando la técnica de inmunoensayo ELISA después de la inmunización con aluminio o LytB en presencia de Alum. Las inmunoglobulinas analizadas fueron IgG total (A), IgG1 (B), IgG2a (C), IgG2b (D), IgG3 (E) e IgA (F). Los anticuerpos específicos se midieron en suero normal de ratón no inmunizado (línea gris), sueros de ratones inmunizados con Alum (línea roja) y sueros de ratones inmunizados con una mezcla de 20 µg de LytB en presencia de Alum (línea verde). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

1.2. Caracterización de la activación del sistema del complemento mediada por anticuerpos anti-LytB

El sistema del complemento es un componente importante de la respuesta inmune del hospedador contra los patógenos invasores tales como *S. pneumoniae*. La inmunidad del complemento está fuertemente iniciada por los anticuerpos IgG que conducen a la activación

de la vía clásica que es la cascada dominante del complemento frente a patógenos bacterianos, tales como *S. pneumoniae* (Brown *et al.*, 2002b; Yuste *et al.*, 2008b).

Para ello, se analizó la activación de los componentes C1q y C3b en la superficie bacteriana de neumococo analizando al menos dos aislados clínicos de neumococo diferentes pertenecientes a distintos serotipos. Las bacterias fueran incubadas con Alum (control) o una mezcla de suero anti-LytB siguiendo la metodología descrita en Material y Métodos. En el caso de la determinación de C1q se analizó su interacción con aislados clínicos de los serotipos 3 y 23F. La incubación de estos aislados con sueros procedentes de ratones inmunizados con la proteína LytB originó un incremento en el reconocimiento por C1q de los serotipos 3, y 23F en comparación a la incubación con el suero control, tal y como se muestra en la figura 8. Estos resultados indican que la vacunación con LytB origina anticuerpos capaces de activar la vía clásica del complemento frente a *S. pneumoniae* (Fig. 8).

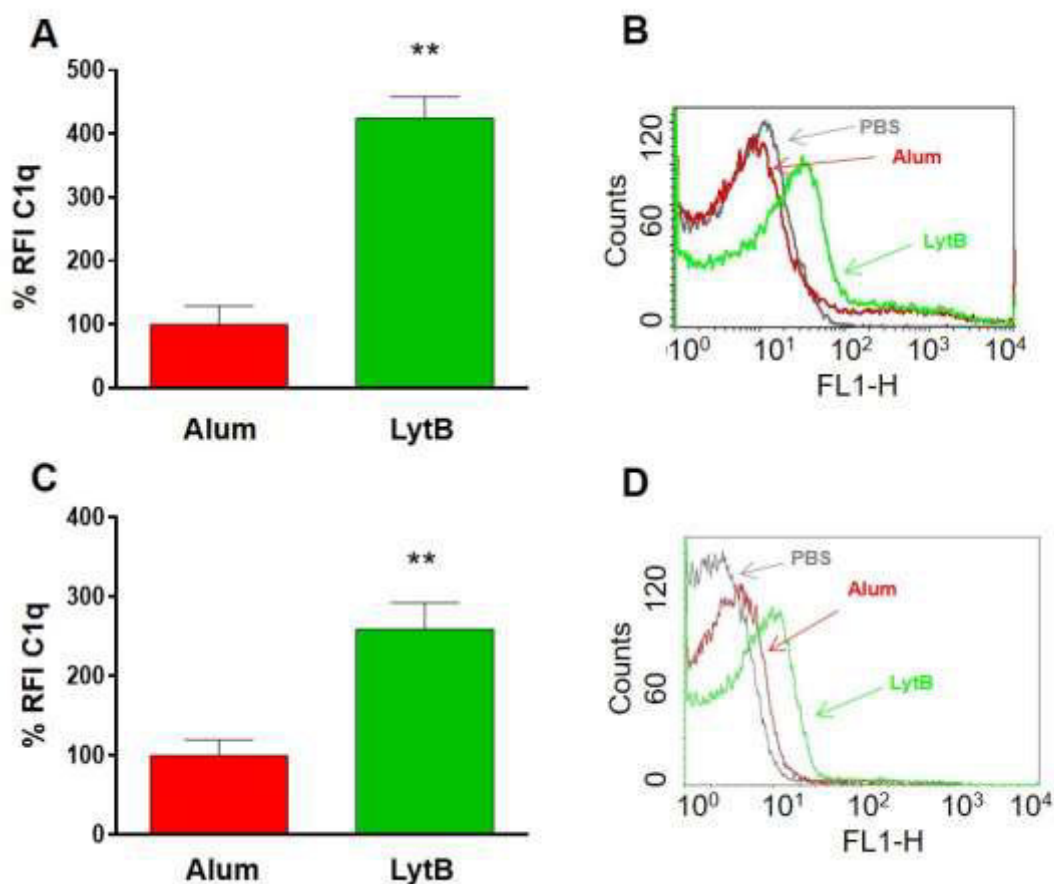
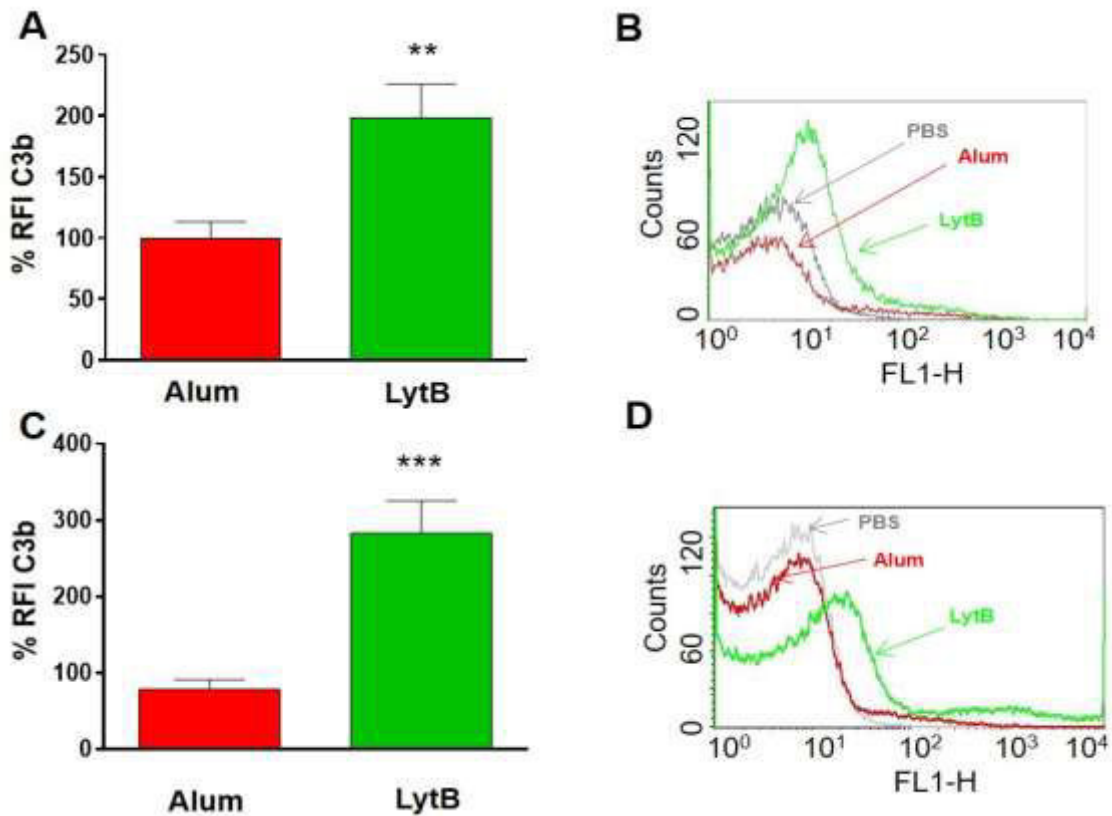


Fig. 8. Activación de la vía clásica del complemento mediada por LytB. (A) Depósito de C1q de ratón en la superficie del aislado clínico del serotipo 3 de *S. pneumoniae* usando citometría de flujo. Sueros de ratones inmunizados con Alum (barra roja); Suero de ratones inmunizados con una mezcla de la proteína LytB (20µg) en presencia de Alum (barra verde). (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de C1q en una cepa del serotipo 3. (C) El reconocimiento por el componente C1q de ratón del aislado clínico del serotipo 23F de *S. pneumoniae* usando citometría de flujo. Sueros de ratones inmunizados con Alum (barra roja); Suero de ratones inmunizados con una mezcla de la proteína LytB (20µg) en presencia de Alum (barra verde). (D) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de C1q en una cepa del serotipo 23F. Los resultados se expresan como % del índice relativo de fluorescencia. Las barras de error representan las desviaciones estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos comparando LytB con el grupo de Alum. (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Una vez que se confirmó que los anticuerpos frente a la proteína LytB son capaces de estimular la activación de la vía clásica del complemento, el siguiente objetivo consistió en determinar si este mayor depósito de C1q en la superficie de neumococo debido a los anticuerpos anti-LytB serían capaces de activar el reconocimiento por el componente clave C3b. Para ello, se incubaron aislados clínicos de neumococo pertenecientes a 3 serotipos diferentes como fueron los serotipos 3, 8 y 23F en presencia de suero no inmune, suero procedente de animales inmunizados con Alum y suero procedente de animales vacunados con LytB en presencia de Alum. La inmunización con LytB originó anticuerpos capaces de activar el reconocimiento por el componente C3b en la superficie de todos los aislados analizados, confirmando que la vacunación con LytB induce la activación de la inmunidad mediada por el sistema del complemento frente a diferentes aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* (Fig. 9).



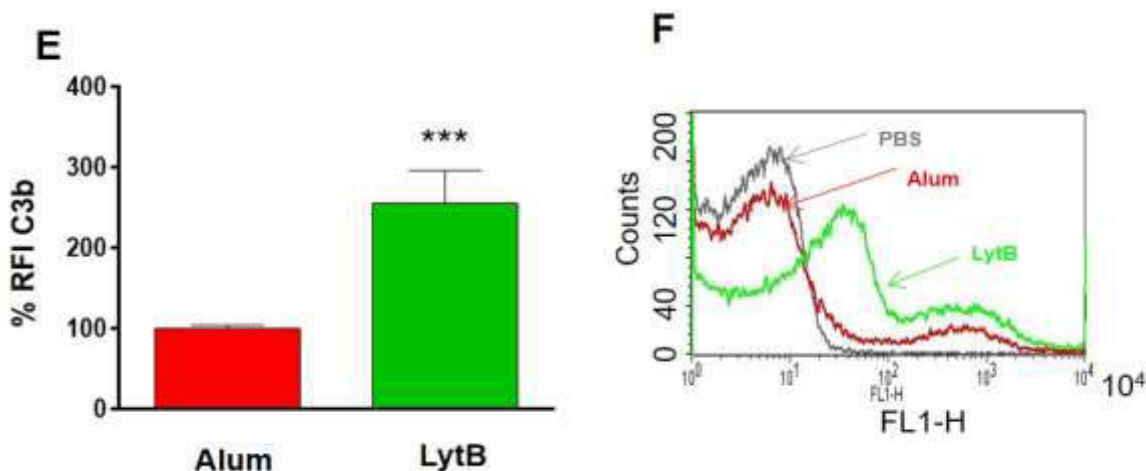


Figura 9. El reconocimiento de *S. pneumoniae* por el componente C3b del complemento. (A) Depósito de C3b de ratón en la superficie del aislado clínico del serotipo 3 de neumococo usando citometría de flujo. Sueros de ratones inmunizados con Alum (barra roja); Suero de ratones inmunizados con una mezcla de la proteína LytB (20µg) en presencia de Alum (barra verde). (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de C3b en una cepa del serotipo 3. (C) El reconocimiento por el componente C3b de ratón del aislado clínico del serotipo 8 de neumococo usando citometría de flujo. Sueros de ratones inmunizados con Alum (barra roja); Suero de ratones inmunizados con una mezcla de la proteína LytB (20µg) en presencia de Alum (barra verde). (D) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de C3b en una cepa del serotipo 8. (E) El reconocimiento por el componente C3b de ratón del aislado clínico del serotipo 23F de *S. pneumoniae* usando citometría de flujo. Sueros de ratones inmunizados con Alum (barra roja); Suero de ratones inmunizados con una mezcla de la proteína LytB (20µg) en presencia de Alum (barra verde). (F) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de C3b en una cepa del serotipo 23F. Los resultados se expresan como % del índice relativo de fluorescencia. Las barras de error representan las desviaciones estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos comparando LytB con el grupo de Alum. (Test t de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

1.3. La inmunización con LytB induce la opsonofagocitosis de *S. pneumoniae*

Los anticuerpos producidos tras la inmunización con LytB activan el proceso de opsonización y pueden contribuir a la defensa del hospedador mediante la inducción de la opsonofagocitosis bacteriana.

Para investigar esta posibilidad, se realizaron experimentos de fagocitosis mediante citómetro de flujo. Se utilizó la línea celular humana HL-60 diferenciada a granulocitos, que es una línea celular ampliamente utilizada en todo el mundo para medir la fagocitosis inducida por los anticuerpos generados con las actuales vacunas conjugadas frente a neumococo (Romero-Steiner *et al.*, 1997).

Estos experimentos fueron realizados utilizando los aislados clínicos del serotipo 3, 8 y 23F de *S. pneumoniae* (Fig. 10). Estas cepas se marcaron en primer lugar con el fluorocromo FAM-SE y se incubaron con sueros de ratones inmunizados solamente con Alum o sueros de ratones inmunizados con la proteína LytB en presencia de Alum. Como controles negativos, se incluyeron bacterias incubadas con HBSS para evaluar el nivel de fagocitosis sin componentes del suero. En ausencia de complemento (control HBSS), la fagocitosis se redujo en comparación con el grupo de Alum y este bajo nivel de fagocitosis mucho más marcado si se compara frente al suero con anticuerpos anti-LytB confirmando la importancia de la presencia de componentes del complemento en la fagocitosis mediada por los anticuerpos generados frente a la proteína LytB (Figura 10). Por el contrario, el nivel de fagocitosis fue

significativamente mayor cuando las bacterias se incubaron en suero procedente de animales inmunizados con LytB en comparación al grupo de Alum y al control de HBSS (Figura 10). Estos resultados confirman que la vacunación con LytB induce anticuerpos capaces de estimular la fagocitosis de neumococo.

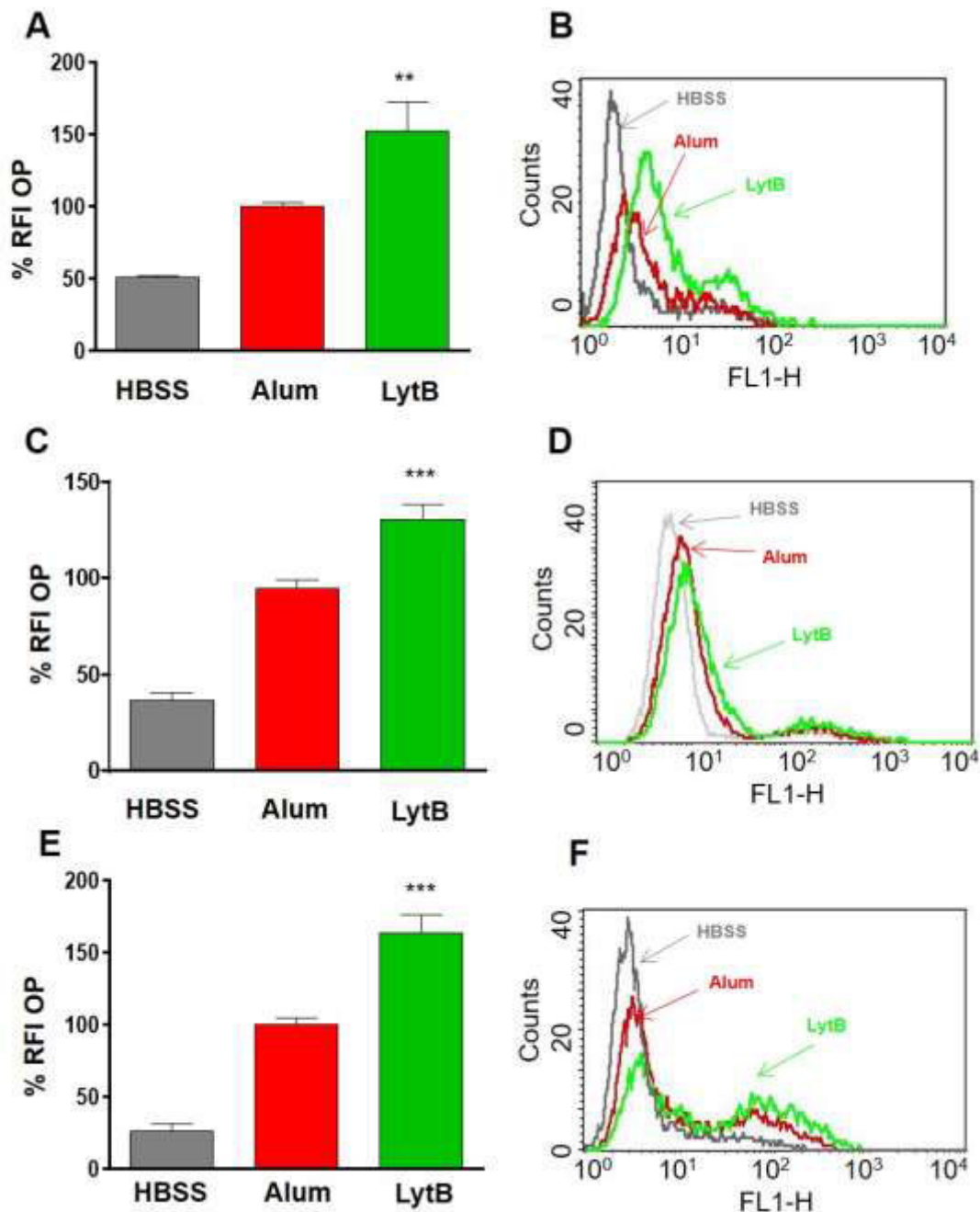


Figura 10. Opsonofagocitosis (OP) por citometría de flujo. En estos ensayos se utilizó la línea celular HL-60 diferenciada a neutrófilos polimorfonucleares. Los aislados clínicos de *S. pneumoniae* se incubaron con HBSS (barra gris), o con sueros de ratones inmunizados con Alum (barra roja) o bien con sueros de ratones inmunizados con la proteína LytB (20µg) en presencia de Alum (barra verde). (A) OP de un aislado clínico del serotipo 3. (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo de OP de la cepa del serotipo 3. (C) OP del aislado clínico del serotipo 8. (D) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo de OP de la cepa del serotipo 8. (E) OP del aislado clínico del serotipo 23F. (F) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo de OP de la cepa del serotipo 23F. Los resultados se expresan como % del índice relativo de fluorescencia. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos comparando el grupo inmunizado con la proteína LytB con el grupo de Alum. (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

1.4. Los anticuerpos anti-LytB aumentan la longitud bacteriana

Teniendo en cuenta que la proteína LytB participa en la separación de las células hijas y por tanto en la división celular, una posibilidad es que los anticuerpos generados frente a la proteína LytB tras el proceso de inmunización podrían afectar a la función fisiológica de esta proteína alterando este proceso de separación celular. Con objeto de analizar esta hipótesis, se investigó el impacto de la inmunización con LytB en la morfología de *S. pneumoniae*. Para este ensayo, el aislado clínico del serotipo 23F se incubó durante 4 horas a 37°C con diferentes sueros; incluyendo suero normal de ratón no inmunizado (SNI), sueros de ratones inmunizados con adyuvante (Alum) y sueros de ratones inmunizados con 20µg de LytB en presencia de Alum. La incubación de *S. pneumoniae* con SNI (diluido 1/200) o con suero de ratones inmunizados con Alum (diluido 1/200), mostró la típica morfología de diplococos, tal y como se muestra en las figuras 11A y 11B.

Sin embargo, la incubación con sueros que contenían anticuerpos específicos frente a la proteína LytB incrementaron la longitud bacteriana, favoreciendo la formación de cadenas cortas y largas en las células neumocócicas, lo que es compatible con un patrón alterado de separación celular (Fig. 11C). Este fenotipo de morfología alterada también se observó con diluciones mayores del suero (1/2000, datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que los anticuerpos generados tras la inmunización con LytB reconocen la proteína en la superficie bacteriana, bloqueando su actividad, lo que afectaría a la división celular inducida por el correcto funcionamiento de LytB.

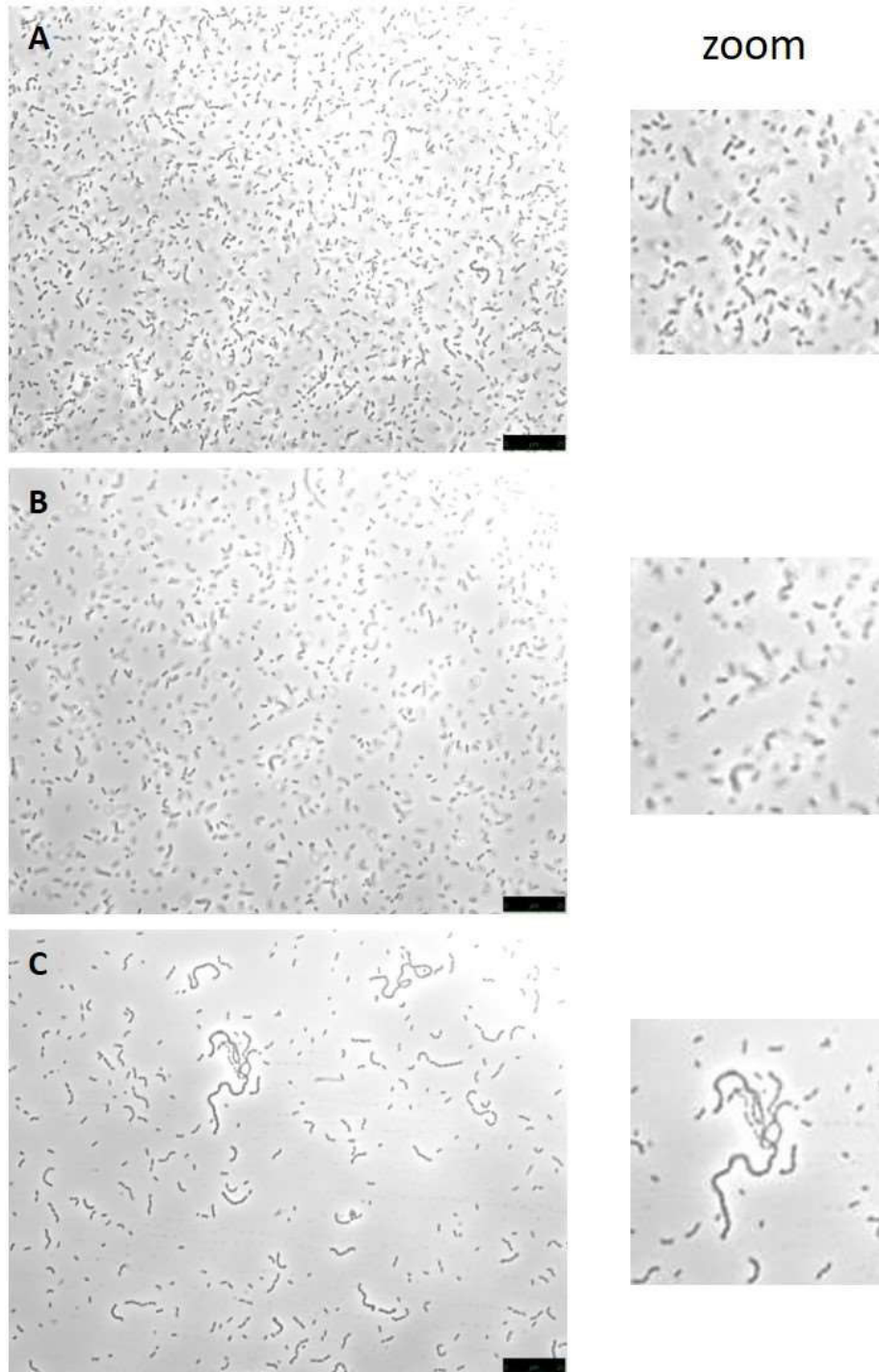


Figura 11. Imágenes de microscopía de contraste de fases. Aislado clínico de *S. pneumoniae* del serotipo 23F expuesto a diferentes sueros murinos durante 4 horas a 37°C. (A) Incubación con suero normal de ratones no inmunizados. (B) Incubación con suero de ratones inmunizados con Alum. (C) Incubación con sueros de ratones inmunizados con LytB (20µg) en presencia de Alum. Las barras equivalen a 25 µm.

1.5. La vacunación con LytB no afecta a la proporción de linfocitos T

La activación de la respuesta celular tras la inmunización con proteínas antigénicas podría ser protectora frente a la infección por neumococo. Para este propósito, grupos de ratones

fueron inmunizados con Alum o con la proteína LytB en presencia de Alum como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez realizadas las tres inmunizaciones, los ratones fueron sacrificados con pentobarbital con el fin de obtener el bazo para detectar los niveles de linfocitos CD3, CD4 y CD8. Los resultados obtenidos confirmaron que la vacunación con LytB no afectó a la proporción de las diferentes poblaciones de células T en comparación a la inmunización de ratones con Alum o al grupo de ratones no inmunizado (Fig. 12).

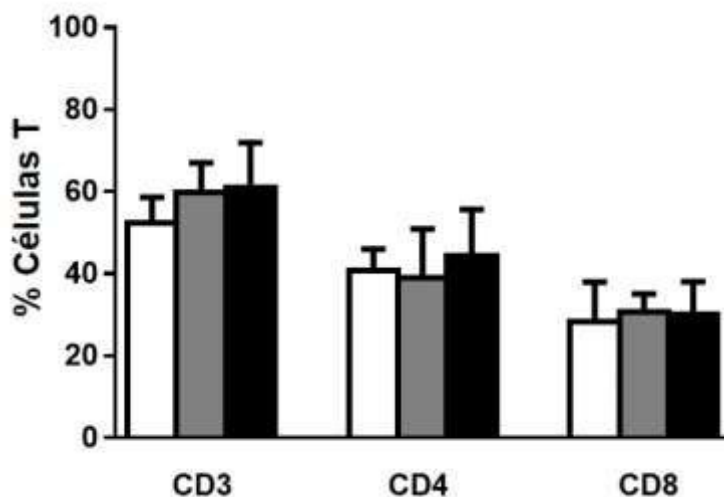


Figura 12. Activación de células T analizadas como proporción de CD3, CD4 y CD8 en células del bazo de ratones. Células de ratones no inmunizados (barras blancas), células de ratones inmunizados con Alum (barras grises) y células de ratones inmunizados con LytB mezclado con Alum (barras negras). Las barras de error representan la desviación estándar. Los experimentos se repitieron tres veces.

1.6. La inmunización con LytB protege a los ratones frente a la infección por *S. pneumoniae*

Una vez demostrada la inmunogenicidad de la proteína LytB, se decidió analizar su capacidad protectora frente a la infección neumocócica invasiva. Para ello, se pusieron a punto dos modelos infecciosos en ratón con el fin de estudiar la actividad protectora de los anticuerpos anti-LytB frente a la neumonía bacteriémica y la sepsis neumocócica como modelos murinos de infección invasiva.

1.6.1. Protección frente a la neumonía neumocócica invasiva

Para caracterizar la eficacia de LytB como antígeno candidato a vacuna, se evaluó el grado de protección que ofrece esta proteína en un modelo murino de neumonía por *S. pneumoniae*. La principal razón por la que se estudió la actividad protectora de LytB frente a esta patología infecciosa es porque la neumonía es una de las principales causas de mortalidad infantil en el mundo, produciendo más muertes que el SIDA, la malaria y el sarampión juntos, siendo neumococo, el principal agente etiológico de las neumonías adquiridas en la comunidad (O'Brien *et al.*, 2009; Wardlaw *et al.*, 2006). Para este modelo, los ratones fueron vacunados con 20 µg de LytB por vía intraperitoneal. La inoculación bacteriana se realizó por vía intranasal en animales previamente anestesiados con isofluorano. Se analizó la protección frente a la neumonía producida por los aislados clínicos de los serotipos 3 o 23F determinando

diariamente los niveles de bacteria en sangre, así como los registros de mortalidad y supervivencia durante un periodo de 7 días (Figs. 13 y 14).

Las tasas de supervivencia que se observaron frente a la neumonía producida por el aislado clínico de serotipo 3 oscilaron entre el 40% en el grupo vacunado con LytB frente a la ausencia de protección en el grupo control de Alum (Fig. 13A). Esta mayor supervivencia en el grupo de animales inmunizados con LytB se asoció a una reducción significativa en los niveles de bacteria en sangre en comparación a los obtenidos en el grupo de ratones inmunizados sólo con el adyuvante Alum (Fig. 13B).

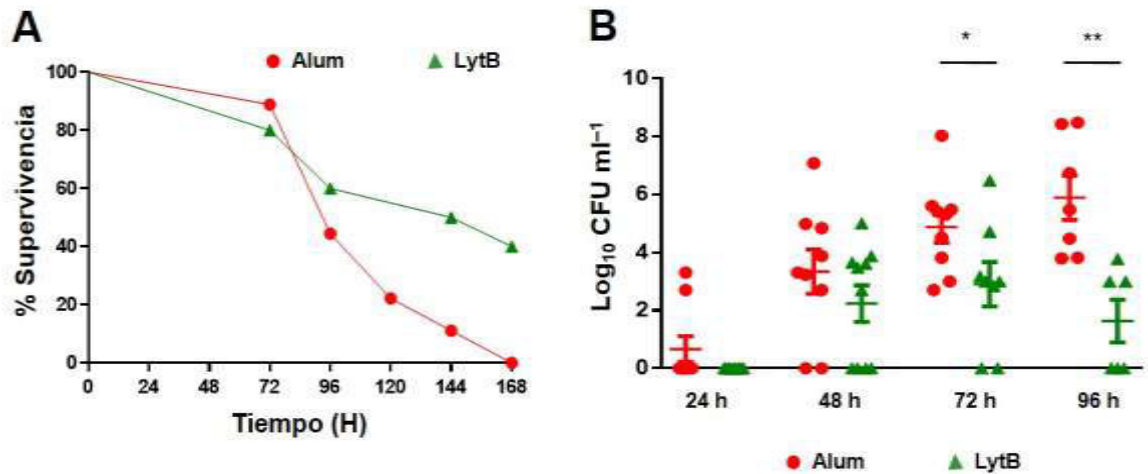


Figura 13. Modelo murino de neumonía neumocócica causado por el aislado clínico del serotipo 3. (A) Niveles de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con Alum (círculos rojos) y en ratones inmunizados con 20 µg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). (B) Recuentos bacterianos en sangre a las 24h, 48h, 72h y 96h de los ratones inmunizados con Alum (círculos rojos) y de los ratones inmunizados con 20 µg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos de la inmunización con LytB en comparación con el grupo de Alum. (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Estos experimentos fueron repetidos utilizando un aislado clínico de serotipo 23F confirmando que la vacunación con LytB incrementó la supervivencia de forma significativa ($P < 0.01$) mostrando una protección del 60% en el grupo inmunizado con LytB mientras que en el grupo control de Alum tan sólo sobrevivió el 20% de los animales (Fig. 14A). De nuevo, la vacunación con LytB incrementó la eliminación bacteriana en el torrente circulatorio (Fig. 14B) demostrando que LytB podría ser un prometedor antígeno vacunal frente a la neumonía invasiva producida por *S. pneumoniae*.

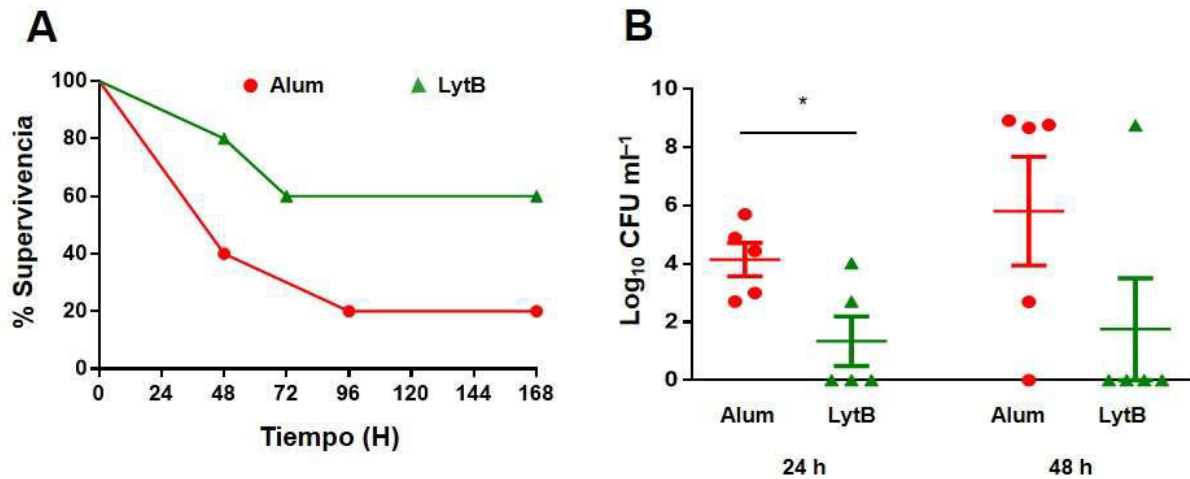


Figura 14. Modelo murino de neumonía neumocócica causada por el aislado clínico del serotipo 23F. (A) Niveles de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con Alum (círculos rojos) y en ratones inmunizados con 20 μ g de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). (B) Recuentos bacterianos en sangre a las 24h y 48h de los ratones inmunizados con Alum (círculos rojos) y de los ratones inmunizados con 20 μ g de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos de la inmunización con LytB en comparación con el grupo de Alum. (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

1.6.2. Modelo murino de sepsis neumocócica

La ENI es un proceso infeccioso devastador asociado a elevadas tasas de mortalidad afectando principalmente a la población infantil, adultos mayores de 65 años de edad y a personas inmunocomprometidas (O'Brien *et al.*, 2009).

La actividad protectora de LytB frente a la ENI se investigó en un modelo de sepsis causado por dos aislados clínicos de neumococo pertenecientes a los serotipos 3 y 23F (Figs. 15 y 16). La vacunación con 20 μ g de LytB indujo cierto grado de protección frente a la sepsis causada por el aislado de serotipo 3 proporcionando una supervivencia del 30% en comparación al grupo inmunizado con Alum (Fig. 15A). Esta mayor supervivencia, fue debida principalmente a que la presencia de anticuerpos frente a LytB en los animales vacunados con la proteína, disminuyó los niveles de bacteria en sangre en las primeras horas de infección (Fig. 15B). La administración de una dosis mayor de LytB como antígeno proteico, permitió mayores niveles de protección frente a la sepsis producida por este aislado de serotipo 3, siendo del 70% en el grupo vacunado con LytB frente a tan sólo el 10% obtenido tras la inmunización con Alum (Fig. 15C).

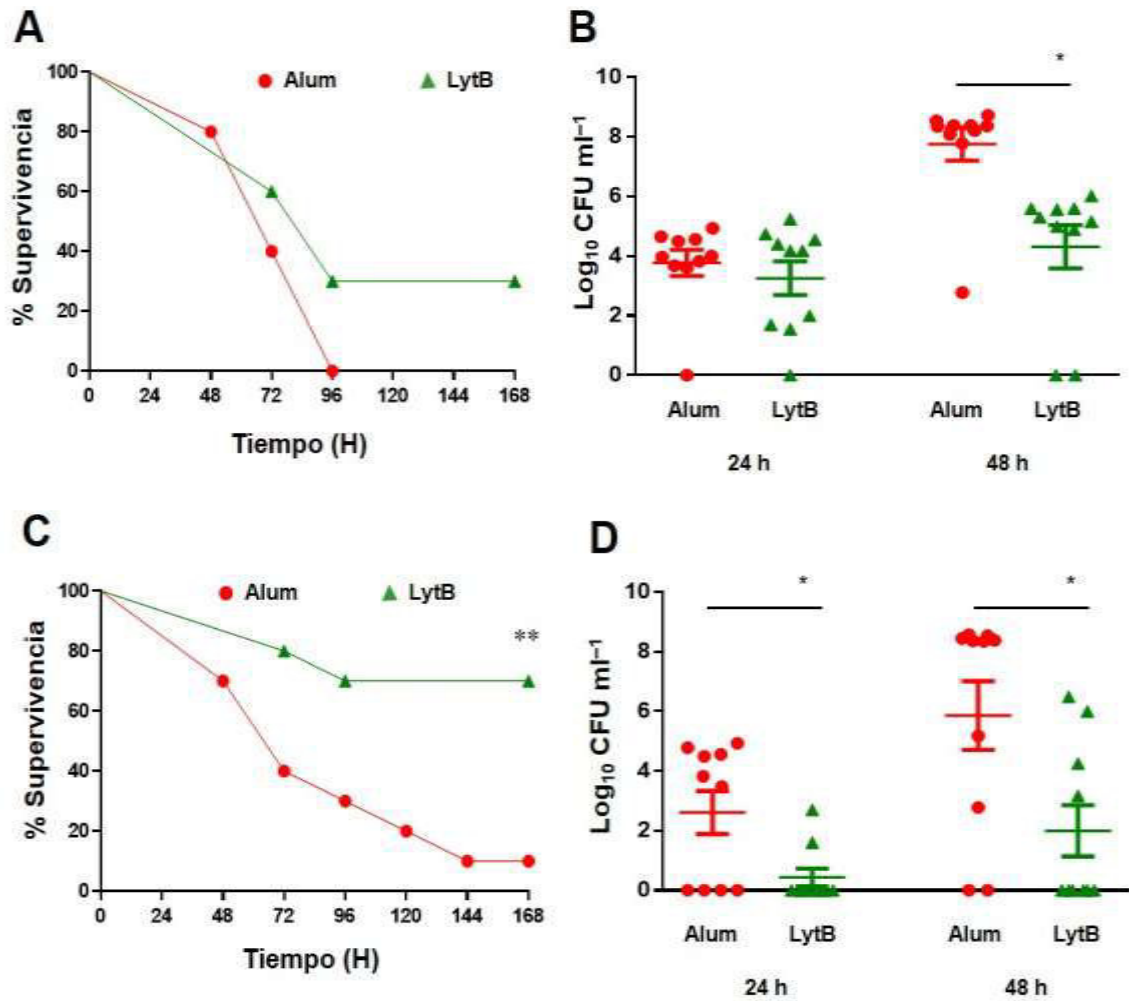


Figura 15. Modelo murino de sepsis neumocócica causada por el aislado clínico del serotipo 3. (A) Niveles de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con Alum (círculos rojos) y ratones inmunizados con 20 µg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). (B) Recuentos bacterianos en sangre a las 24h y 48h de los ratones inmunizados con Alum (círculos rojos) y de los ratones inmunizados con 20 µg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). (C) Niveles de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con Alum (círculos rojos) y ratones inmunizados con 40 µg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). (D) Recuentos bacterianos en sangre a las 24h y 48h de los ratones inmunizados con Alum (círculos rojos) y de los ratones inmunizados con 40 µg de en presencia de Alum (triángulos verdes). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos de la inmunización con LytB en comparación con el grupo de Alum. (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Esta elevada protección estuvo asociada a una reducción significativa en los niveles de bacteria en sangre en las primeras horas de infección en el grupo de animales vacunados con LytB (Fig. 15D). Además, se observó que un elevado número de ratones inmunizados con LytB fueron capaces de eliminar por completo la bacteria presente en la circulación sistémica en comparación al grupo inmunizado con Alum (Fig. 15D).

Por otro lado, se estudió la protección conferida por los anticuerpos frente a LytB en un modelo de sepsis producido por un aislado clínico de serotipo 23F (Fig. 16). La vacunación con 20 μg de LytB permitió incrementar la supervivencia en comparación a la inmunización con Alum siendo del 70% en el grupo de LytB y del 30% en el grupo de Alum (Fig. 16A). Esta mayor protección tras la vacunación con LytB estuvo asociada con una disminución significativa de los niveles de bacteria en sangre en las primeras horas de la infección (Fig. 16B) confirmando que LytB es una prometedora proteína candidata a vacuna frente a la sepsis neumocócica.

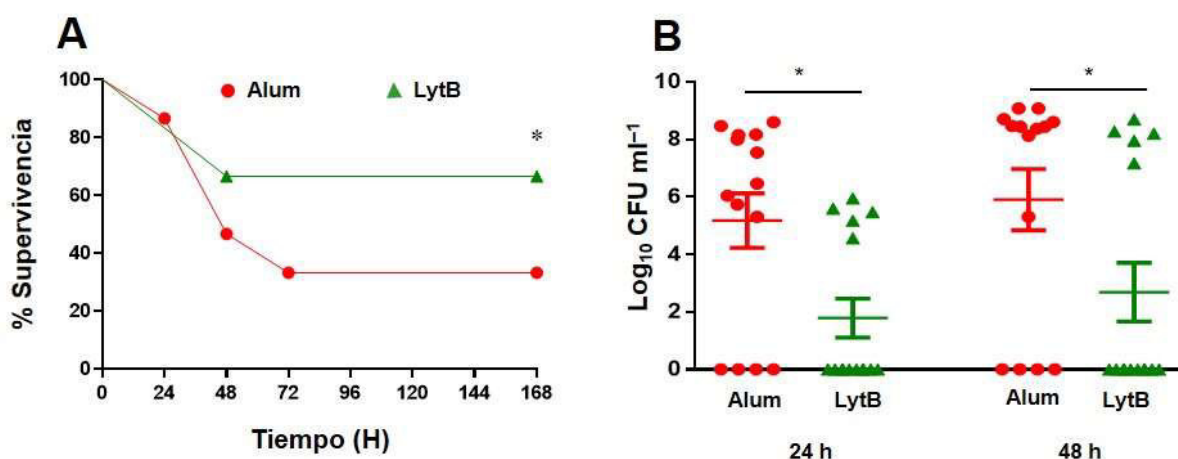


Figura 16. Modelo murino de sepsis neumocócica causada por el aislado clínico del serotipo 23F. Niveles de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con Alum (círculos rojos) y ratones inmunizados con 20 μg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). (B) Recuentos bacterianos en sangre a las 24h y 48h de los ratones inmunizados con Alum (círculos rojos) y de los ratones inmunizados con 20 μg de LytB en presencia de Alum (triángulos verdes). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos de la inmunización con LytB en comparación con el grupo de Alum. (Test t de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

1.7. Análisis molecular de las proteínas LytB de los diferentes aislados de *S. pneumoniae*

La proteína LytB es una proteína bien conservada entre los diferentes aislados de neumococo descritos a pesar de mostrar cierto grado de polimorfismo en el número de repeticiones del dominio de unión a colina (Moscoso *et al.*, 2005). Para ello, se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína LytB de los aislados clínicos de serotipo 3 y 23F y se comparó con la secuencia de LytB de las cepas D39 (serotipo 2) y TIGR4 (serotipo 4) depositadas en las bases de datos. Los resultados obtenidos mostraron que la LytB del aislado clínico de serotipo 3 carece de dos repeticiones de unión a colina en comparación a la LytB de los aislados de serotipo 23F y 2 (Fig. 17). Sin embargo, la LytB las cepas de serotipo 23F y 2 fueron muy similares entre ellas (Fig. 17).

D39	MKKVRFIFLALLFFLASPEGAMA	SDGTWQGKQYL	KEDGSQAANEWVFDTHYQSWFYI	KAD	60
TIGR4	MKKVRFIFLALLFFLASPEGAMA	SDGTWQGKQYL	KEDGSQAANEWVFDTHYQSWFYI	KAD	60
48	MKKVRFIFLALLFFLASPEGAMA	SDGTWQGKQYL	KEDGSQAANEWVFDTHYQSWFYI	KAD	60
957	MKKVRFIFLALLFFLASPEGAMA	SDGTWQGKQYL	KEDGSQAANEWVFDTHYQSWFYI	KAD	60
*****:*****					
D39	ANYAENEWLKQDDYFYI	KSGGYMAKSEWVEDKGFAYI	DQDGKMKRNNAVGTSYVVGATG		120
TIGR4	ANYAENEWLKQDDYFYI	KSGGYMAKSEWVEDKGFAYI	DQDGKMKRNNAVGTSYVVGATG		120
48	ANYAENEWLKQDDYFYI	KSGGYMAKSEWVEDKGFAYI	DQDGKMKRNNAVGTSYVVGATG		120
957	ANYAENEWLKQDDYFYI	KSGGYMAKSEWVEDKGFAYI	DQDGKMKRNNAVGTSYVVGATG		120

D39	AKVIEDWVYDSQYDAWFYI	KADGQHAKEKWLQIKGKDYFF	KSGGYLLTSQWINQAYV	NAS	180
TIGR4	AKVIEDWVYDSQYDAWFYI	KADGQHAKEKWLQIKGKDYFF	KSGGYLLTSQWINQAYV	NAS	180
48	AKVIEDWVYDSQYDAWFYI	KADGQHAKEKWLQIKGKDYFF	KSGGYLLTSQWINQAYV	NAS	180
957	AKVIEDWVYDSQYDAWFYI	KADGQHAKEKWLQIKGKDYFF	KSGGYLLTSQWINQAYV	NAS	180
*****:*****					
D39	GAKVQQGWLFDKQYQSWFYI	KENGNYADKEWIFENGHYIYL	KSGGYMAANEWIWDKESWF		240
TIGR4	GAKVQQGWLFDKQYQSWFYI	KENGNYADKEWIFENGHYIYL	KSGGYMAANEWIWDKESWF		240
48	GAKVQQGWLFDKQYQSWFYI	KENGNYADKEWIFENGHYIYL	KSGGYMAANEWIWDKESWF		240
957	GAKVQQGWLFDKQYQSWFYI	KENGNYADKEWIFENGHYIYL	KSGGYMAANEWIWDKESWF		240

D39	YI	KFDGKIAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMAANEWIWDKESWFYI	KFDGKMAEKWVYD	300
TIGR4	YI	KFDGKMAEKWVYDSHSQAWYIF	-----	-----	265
48	YI	KFDGKMAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMAANEWIWDKESWFYI	KFDGKMAEKWVYD	300
957	YI	-----	-----	KFDGKMAEKWVYD	256
**					
D39	SHSQAWYIF	KSGGYMTANEWIWDKESWFYI	KSDGKIAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMT	360
TIGR4	-----	KSGGYMTANEWIWDKESWFYI	KSDGKIAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMT	316
48	SHSQAWYIF	KSGGYMTANEWIWDKESWFYI	KSDGKIAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMT	360
957	SHSQAWYIF	KSGGYMTANEWIWDKESWFYI	KFDGKIAEKWVYD	HSQAWYIF	316
-----*****					
D39	ANEWIWDKESWFYI	KSDGKMAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMAKNETVDGYQLGSDCKW		420
TIGR4	ANEWIWDKESWFYI	KSDGKMAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMAKNETVDGYQLGSDCKW		376 (2)
48	ANEWIWDKESWFYI	KSDGKMAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMAKNETVDGYQLGSDCKW		420
957	ANEWIWDKESWFYI	KSDGKMAEKWVYDSHSQAWYIF	KSGGYMAKNETVDGYQLGSDCKW		376
*****:*****					
D39	LGKATNK	NAAYYQVVPVTANVYDSGGEKLSYISQGSVVWLDKDRKSDDKRLAITISGLS			480
TIGR4	LGKK	TENAAAYQVVPVTANVYDSGGEKLSYISQGSVVWLDKDRKSDDKRLAITISGLS			436 (62)
48	LGKATNK	NAAYYQVVPVTANVYDSGGEKLSYISQGSVVWLDKDRKSDDKRLAITISGLS			480
957	LGKATNK	ENAAAYQVVPVTANVYDSGGEKLSYISQGSVVWLDKDRKSDDKRLAITISGLS			436
*****:*****					
D39	GYMKTEDLQALDAS	KDFIPYYESDGHFRFYHYVAQNASIPVASHLSDMEVGKYYAD	GLH		540
TIGR4	GYMKTEDLQALDAS	KDFIPYYESDGHFRFYHYVAQNASIPVASHLSDMEVGKYYAD	GLH		496 (122)
48	GYMKTEDLQALDAS	KDFIPYYESDGHFRFYHYVAQNASIPVASHLSDMEVGKYYAD	GLH		540
957	GYMKTEDLQALDAS	KDFIPYYESDGHFRFYHYVAQNASIPVASHLSDMEVGKYYAD	GLH		496
*****:					
D39	FDGFKLENPFLEKDL	TEATNYSAEELDKVFSLLNINNSLLENKCATFKEAEHYHINALY			600
TIGR4	FDGFKLENPFLEKDL	TEATNYSAEELDKVFSLLNINNSLLENKCATFKEAEHYHINALY			556 (182)
48	FDGFKLENPFLEKDL	TEATNYSAEELDKVFSLLNINNSLLENKCATFKEAEHYHINALY			600
957	FDGFKLENPFLEKDL	TEATNYSAEELDKVFSLLNINNSLLENKCATFKEAEHYHINALY			556

D39	*	LLAHSALSNWGRSKIADKNNFFGITAYDTTPYLSAKTFDDVDKGI LGATKWIKENYID			660
TIGR4		LLAHSALSNWGRSKIADKNNFFGITAYDTTPYLSAKTFDDVDKGI LGATKWIKENYID			616 (242)
48		LLAHSALSNWGRSKIADKNNFFGITAYDTTPYLSAKTFDDVDKGI LGATKWIKENYID			660
957		LLAHSALSNWGRSKIADKNNFFGITAYDTTPYLSAKTFDDVDKGI LGATKWIKENYID			616

D39	RGRTFLGNKASGMNVEYASDPYWGKIASVMMKINEKLGKGD				702
TIGR4	RGRTFLGNKASGMNVEYASDPYWGKIASVMMKINEKLGKGD				658 (284)
48	RGRTFLGNKASGMNVEYASDPYWGKIASVMMKINEKLGKGD				702
957	RGRTFLGNKASGMNVEYASDPYWGKIASVMMKINEKLGKGD				658

Figura 17. Alineamiento múltiple de las glucosaminidasas LytB de las cepas 48 (serotipo 23F), 957 (serotipo 3), D39 (serotipo 2) y TIGR4 (serotipo 4). La secuencia con fondo negro corresponde al péptido señal. Las repeticiones de unión a colina están marcadas alternativamente en fondos de color gris y verde. Los dominios LytB_{SH3b}, LytB_{Ww}, y LytB_{GH73} (Bai *et al.*, 2014) se indican en fondos de color amarillo, rosa y azul respectivamente. El residuo catalítico Glu está marcado con una estrella roja. Las posiciones de los aminoácidos del fragmento de la proteína cuya estructura tridimensional ha sido recientemente determinada (Bai *et al.*, 2014) se indican en el lado derecho en paréntesis. Los guiones indican los huecos introducidos para optimizar el alineamiento. Los asteriscos indican las posiciones donde coinciden todas las secuencias.

2. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS UTILIZANDO ENZIMAS LÍTICAS PARA REDUCIR LA COLONIZACIÓN NEUMOCÓCICA DEL TRACTO RESPIRATORIO

La colonización asintomática de la nasofaringe es un prerrequisito para el desarrollo de las diferentes infecciones causadas por *S. pneumoniae* incluyendo la otitis media aguda, sinusitis, neumonía adquirida en la comunidad, sepsis y meningitis. Esta colonización es más frecuente en la población infantil pudiendo estar colonizados con varios serotipos de manera simultánea (Bogaert *et al.*, 2004; Koedel *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2009). De hecho, el éxito de la colonización del tracto respiratorio superior juega un papel crítico para la diseminación horizontal y para la progresión del proceso infeccioso siendo la ENI, la manifestación clínica más severa (van der Poll y Opal, 2009). Por otro lado, la colonización del tracto respiratorio inferior, está asociada a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en la que las exacerbaciones y la inflamación pulmonar son aspectos importantes que están relacionados con la aparición de infecciones neumocócicas recurrentes en estos pacientes (Sethi y Murphy, 2008). El tratamiento antimicrobiano utilizando lisinas codificadas por fagos (conocidas como enzibióticos), es una alternativa al uso de los antibióticos convencionales para eliminar las infecciones bacterianas, ya que las lisinas fágicas son capaces de matar a las bacterias susceptibles mediante la rotura de enlaces específicos del peptidoglicano provocando de este modo, la lisis osmótica celular (Hermoso *et al.*, 2007; Pastagia *et al.*, 2013). Este tipo de terapia ha sido propuesta con anterioridad, siendo efectiva frente a las infecciones neumocócicas, y tiene la ventaja frente a los antibióticos convencionales, de poseer una elevada especificidad frente a su diana bacteriana (Grandgirard *et al.*, 2008; Hermoso *et al.*, 2007; Jado *et al.*, 2003; Pastagia *et al.*, 2013; Witzentrath *et al.*, 2009).

Basándonos en estas evidencias científicas, el siguiente gran objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en analizar la actividad antimicrobiana de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 en la eliminación del proceso de colonización de neumococo del tracto respiratorio superior e inferior. Además, se estudió la capacidad de estas enzimas líticas para reducir el estado de portador en un modelo murino de colonización de la nasofaringe, ya que es la primera fase del proceso de patogénesis neumocócica, y, por tanto, del posterior desarrollo de la ENI.

2.1. Concentración mínima inhibitoria de los antibióticos convencionales y de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 frente a los 3 aislados clínicos del estudio

Para cada una de los tres aislados clínicos de *S. pneumoniae* empleados en este estudio se determinó la CMI para las tres enzimas líticas utilizadas (Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711) y además se incluyó el antibiótico AMX como antibiótico de amplio espectro y de utilización frecuente frente a las infecciones respiratorias. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para las CMIs de los diferentes compuestos.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria de amoxicilina y las diferentes enzimas líticas frente a los aislados de neumococo seleccionados

COMPUESTOS	CEPAS (SEROTIPO)		
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	48 (23F)	69 (19F)	3498 (8)
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
AMX	16	2	0.06
Cpl-1	4	8	2
Cpl-7S	64	128	64
Cpl-711	1	4	2

En relación al antibiótico AMX, los resultados obtenidos mostraron que el aislado de serotipo 8 era sensible mientras que el aislado de serotipo 19F era resistente con una CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$. El aislado clínico de serotipo 23F mostró una elevada resistencia a este antimicrobiano, con valores de CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$. Los valores obtenidos para las diferentes enzimas líticas mostraron que la enzima lítica Cpl-711 fue la más activa de las tres analizadas. La enzima lítica Cpl-1 mostró valores más bajos de CMI que los obtenidos con la enzima Cpl-7S.

2.2. Efecto de la amoxicilina sobre la adhesión celular al epitelio respiratorio

En primer lugar, se investigó la capacidad de la AMX para reducir la colonización de neumococo a las células epiteliales humanas del tracto respiratorio superior e inferior. Se utilizó la línea celular D562 como línea celular de epitelio de nasofaringe y la línea celular A549 como línea celular de epitelio pulmonar. Los tres aislados seleccionados, eran resistentes al menos a 3 antimicrobianos de familias diferentes (apartado 1.4 de Material y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con AMX no modificó la adhesión de los neumococos de serotipo 23F y 19F a las células epiteliales del tracto respiratorio (Figs. 18 A–D). Sin embargo, el tratamiento con AMX, sí que fue capaz de reducir la colonización de neumococo a las células epiteliales de nasofaringe para el aislado de serotipo 8 aunque únicamente a las concentraciones más altas de 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 18E). Sin embargo, la exposición a estas mismas dosis no fue capaz de eliminar a la bacteria adherida a las células pulmonares (Fig. 18F).

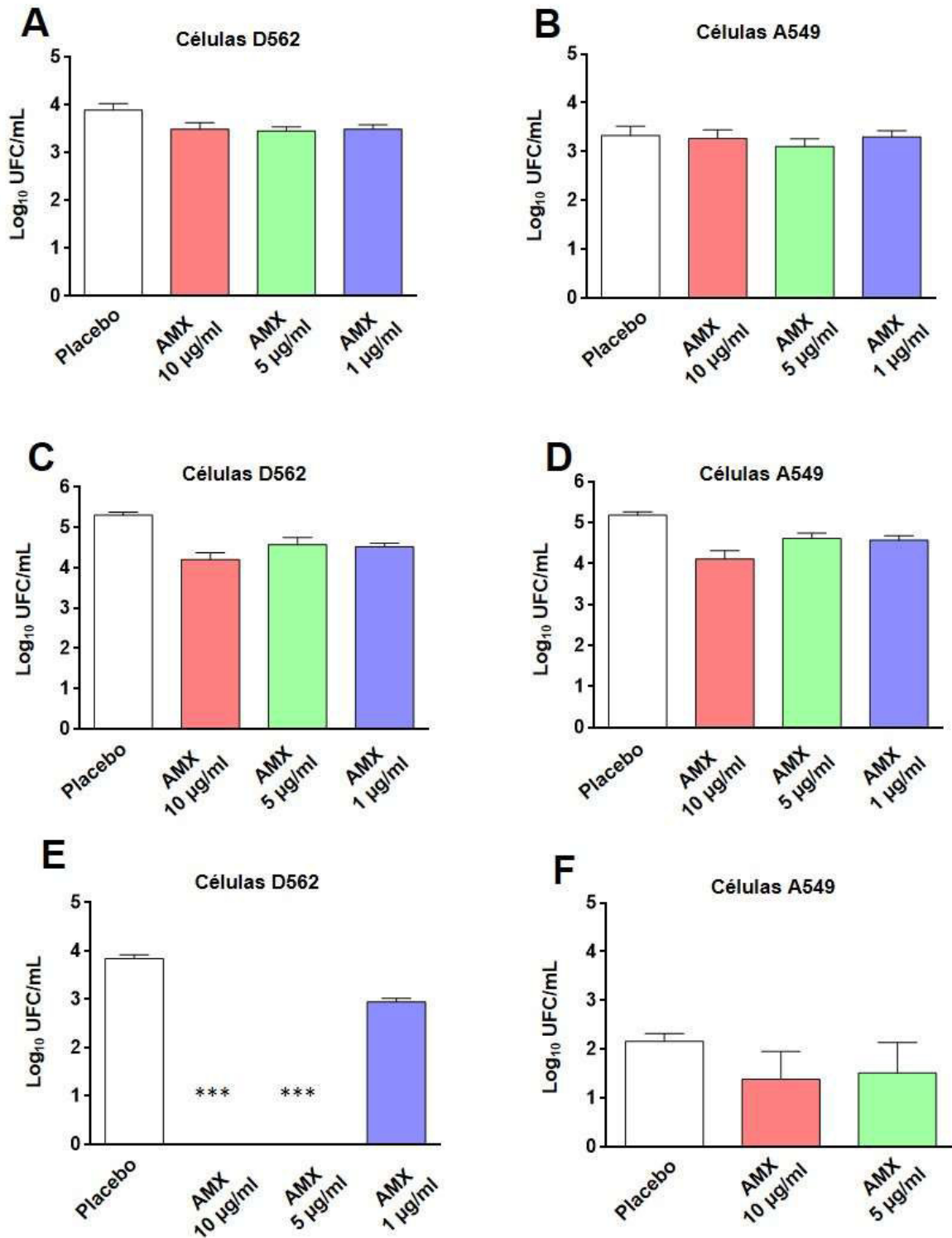


Figura 18. Actividad bactericida de amoxicilina frente a los aislados multirresistente de *S. pneumoniae* colonizando células humanas del epitelio de la nasofaringe (D562) y pulmonar (A549). (A y B) Adhesión del aislado de neumococo de serotipo 23F a células epiteliales expuestas a PBS como placebo (barra blanca) o bien al tratamiento con diferentes concentraciones de AMX. (C y D) Adhesión del aislado de neumococo de serotipo 19F a células epiteliales expuestas a PBS como placebo (barra blanca) o bajo el tratamiento con diferentes concentraciones de AMX. (E y F) Adhesión del aislado de neumococo de serotipo 8 a células epiteliales expuestas a PBS como placebo (barra blanca) o bajo el tratamiento con diferentes concentraciones de AMX. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos en comparación al grupo placebo como control (test *t* de Student de dos colas; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

2.3. Actividad bactericida de los diferentes enzibióticos frente a la colonización de la nasofaringe humana

La línea celular Detroit 562 que es una línea celular humana del epitelio de la nasofaringe, fue infectada con los tres aislados de neumococo multirresistentes descritos anteriormente y tratadas con diferentes dosis de Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 como se ha mencionado con anterioridad. La administración de 10 µg/ml de Cpl-1 y Cpl-711 redujo significativamente la adhesión a las células de la nasofaringe, de todas las cepas investigadas, siendo muy eficientes para eliminar la colonización inducida por las cepas de serotipo 8 y 23F (Figs. 19 A-C). Por el contrario, el enzibiótico Cpl-7S no alteró la adhesión a la nasofaringe a esta concentración y por eso no se probaron dosis más bajas de este compuesto en posteriores ensayos (Fig. 19 A-C)

El tratamiento con 5 µg/ml de Cpl-1 o Cpl-711 siguió siendo eficaz reduciendo de forma eficiente la unión de neumococo a las células de la nasofaringe, con un efecto muy marcado para la quimera Cpl-711, ya que fue capaz de mostrar actividad bactericida frente a la adhesión celular en todos los aislados clínicos analizados (Figs. 19 D-F). Con la dosis más baja de 1 µg/ml, tan sólo, el compuesto Cpl-711 mostró eficacia reduciendo el número de neumococos unidos a las células de la nasofaringe (Figs. 19 G-I). Este resultado, confirmó que esta quimera Cpl-711, fue la lisozima más efectiva para destruir a los neumococos que están adheridos a las células de la nasofaringe humana.

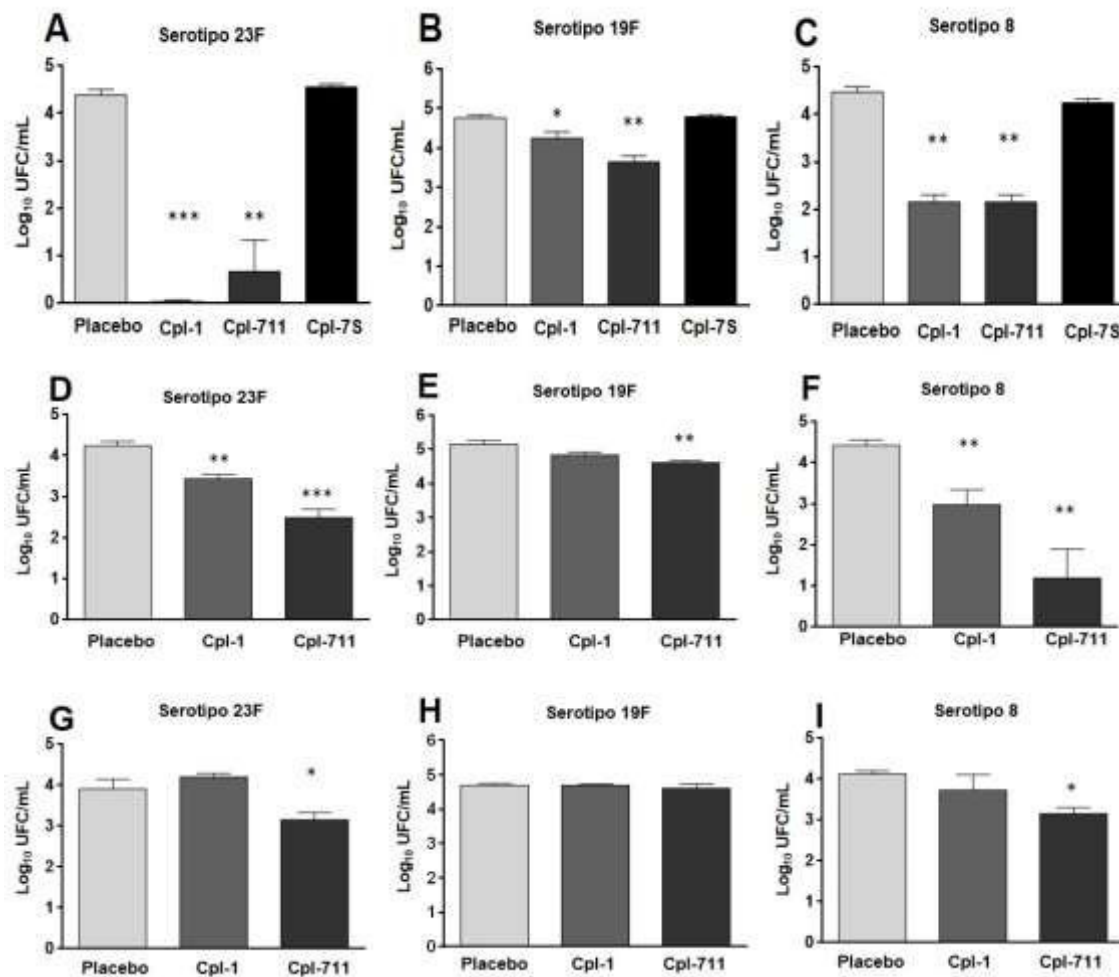


Figura 19. Actividad bactericida de las enzimas líticas frente a los aislados multirresistentes de *S. pneumoniae* colonizando células humanas del epitelio de la nasofaringe. Adhesión de las cepas de neumococo a las células D562 expuestas a PBS como placebo (barra gris claro) o bien al tratamiento con diferentes concentraciones de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-711 y CplL-7S. (A-C) Tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Cpl-1, Cpl-711 y CplL-7S. (D-F) Tratamiento con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Cpl-1 y Cpl-711. (G-I) Tratamiento con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Cpl-1 y Cpl-711. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos en comparación al grupo placebo como control (test *t* de Student de dos colas; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Para confirmar esta hipótesis, los experimentos fueron repetidos, pero utilizando bacteria marcada con el fluorocromo FAMS-SE y se probó el efecto bactericida de la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Cpl-1 y Cpl-711 (Fig. 20). Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con esta concentración de ambos enzibióticos, redujo el número de neumococos adheridos a las células de la nasofaringe, confirmando la capacidad antimicrobiana de estos compuestos para eliminar el proceso de colonización (Figs. 20 A y B).

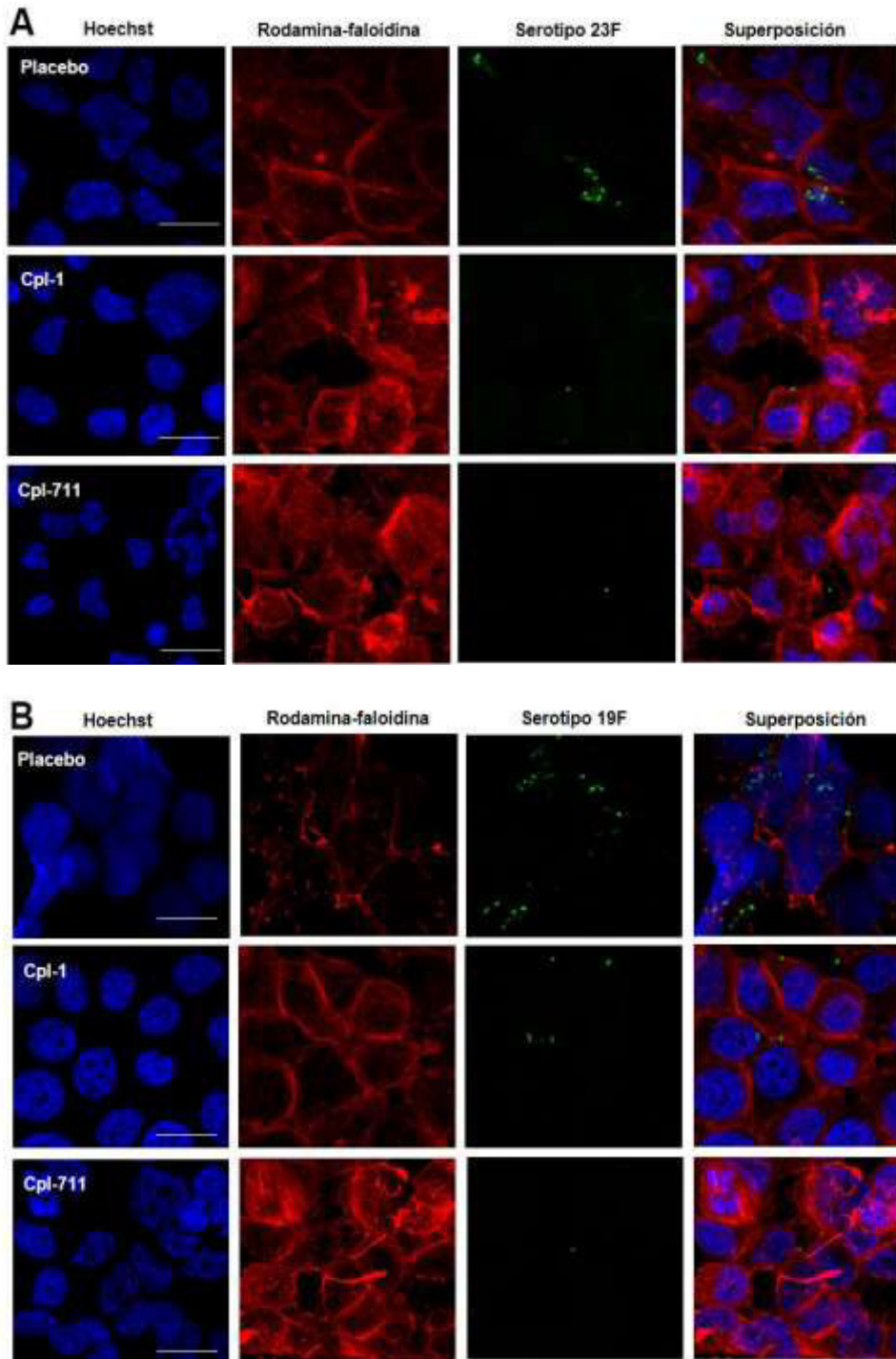


Figura 20. Efecto antimicrobiano las enzimas líticas Cpl-1 y Cpl-711 frente a los aislados de neumococo colonizando células humanas del epitelio de la nasofaringe. La línea celular D562 fue infectada con el aislado de serotipo 23F (A) o 19F (B) y tratadas con PBS como placebo o con 10 µg/ml de Cpl-1 o Cpl-711. Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal. El ADN celular aparece de color azul mediante tinción con Hoechst, el citoesqueleto de actina se visualizó en rojo mediante tinción con rodamina-faloidina y las cepas bacterianas se marcaron con el fluorocromo FAM-SE. Las barras equivalen a 25 µm.

2.4. La utilización de enzibióticos reduce la adhesión de neumococo a las células epiteliales del pulmón

Una vez demostrado que el uso de AMX no disminuye de forma dramática la colonización de células epiteliales producida por aislados multirresistentes (Fig. 21) se analizó el efecto bactericida de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-7S y Cpl-711 en la adhesión de neumococo a las células de la nasofaringe utilizando la línea celular A549. Para ello, se estudiaron los 3 aislados clínicos descritos anteriormente y se probaron hasta 3 dosis diferentes. Con la concentración de 10 µg/ml que fue la dosis más elevada que se analizó, el tratamiento con la enzima lítica Cpl-7S no fue capaz de reducir los niveles de adhesión de ninguna de las cepas investigadas en comparación al grupo control o placebo en el que se administró PBS que fue el vehículo en el que se diluyeron los enzibióticos (Figs. 21 A-C). Por el contrario, la administración de 10 µg/ml de Cpl-1 y Cpl-711 redujo significativamente la unión de neumococo a las células del pulmón siendo este efecto más marcado para la quimera Cpl-711 frente a la colonización inducida por el aislado del serotipo 19F que fue la cepa que mostró mayores tasas de adhesión (Figs. 21 A-C). Debido a que Cpl-7S no afectó a la colonización con la dosis más elevada que se probó, el efecto en colonización de dosis inferiores tan sólo se analizó con las enzimas líticas Cpl-1 y Cpl-711 (Figura 21 D-I). Con la dosis de 5 µg/ml, el enzibiótico Cpl-711 mostró una notable capacidad para disminuir la colonización de las células pulmonares en comparación al compuesto parental Cpl-1 para todas las cepas analizadas (Figs. 21 D-F). Con respecto a la dosis más baja analizada (1 µg/ml), el compuesto Cpl-1 no modificó el patrón de adhesión, mientras que, la quimera Cpl-711 siguió siendo activa reduciendo la adhesión de neumococo a las células epiteliales humanas (Figs 21 G-I).

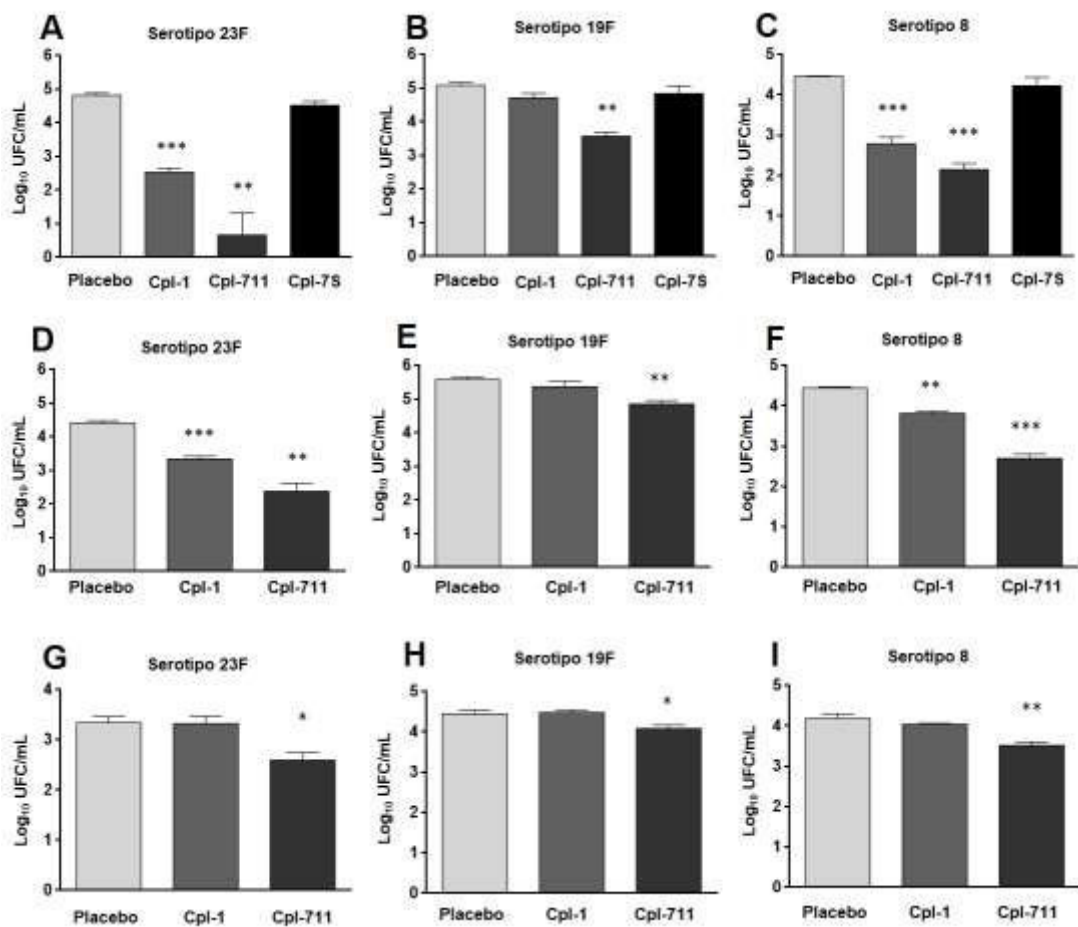


Figura 21. Actividad bactericida de las enzimas líticas frente a los aislados multirresistentes de *S. pneumoniae* colonizando células humanas del epitelio de pulmón. Adhesión de las cepas de neumococo a las células A549 expuestas a PBS como placebo (barra gris claro) o bien al tratamiento con diferentes concentraciones de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S. (A-C) Tratamiento con 10 µg/ml de Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S. (D-F) Tratamiento con 5 µg/ml de Cpl-1 y Cpl-711. (G-I) Tratamiento con 1 µg/ml de Cpl-1 y Cpl-711. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos en comparación al grupo placebo como control (test *t* de Student de dos colas; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$).

Para visualizar el efecto antimicrobiano de estos enzibióticos, se realizaron experimentos de microscopía confocal utilizando la línea celular A549 infectada con los aislados clínicos marcados con el fluorocromo FAM-SE en presencia o ausencia de la dosis de 10 µg/ml de Cpl-1 o Cpl-711. Como se muestra en la figura 22, el tratamiento con estos compuestos destruyó a la bacteria adherida a la superficie epitelial y, consecuentemente, disminuyó el proceso de adhesión. De hecho, el tratamiento con esta dosis, permitió reducir el número de células que presentaban bacteria asociada cuando se analizaron varios campos en el microscopio (Figs. 22 A y B).

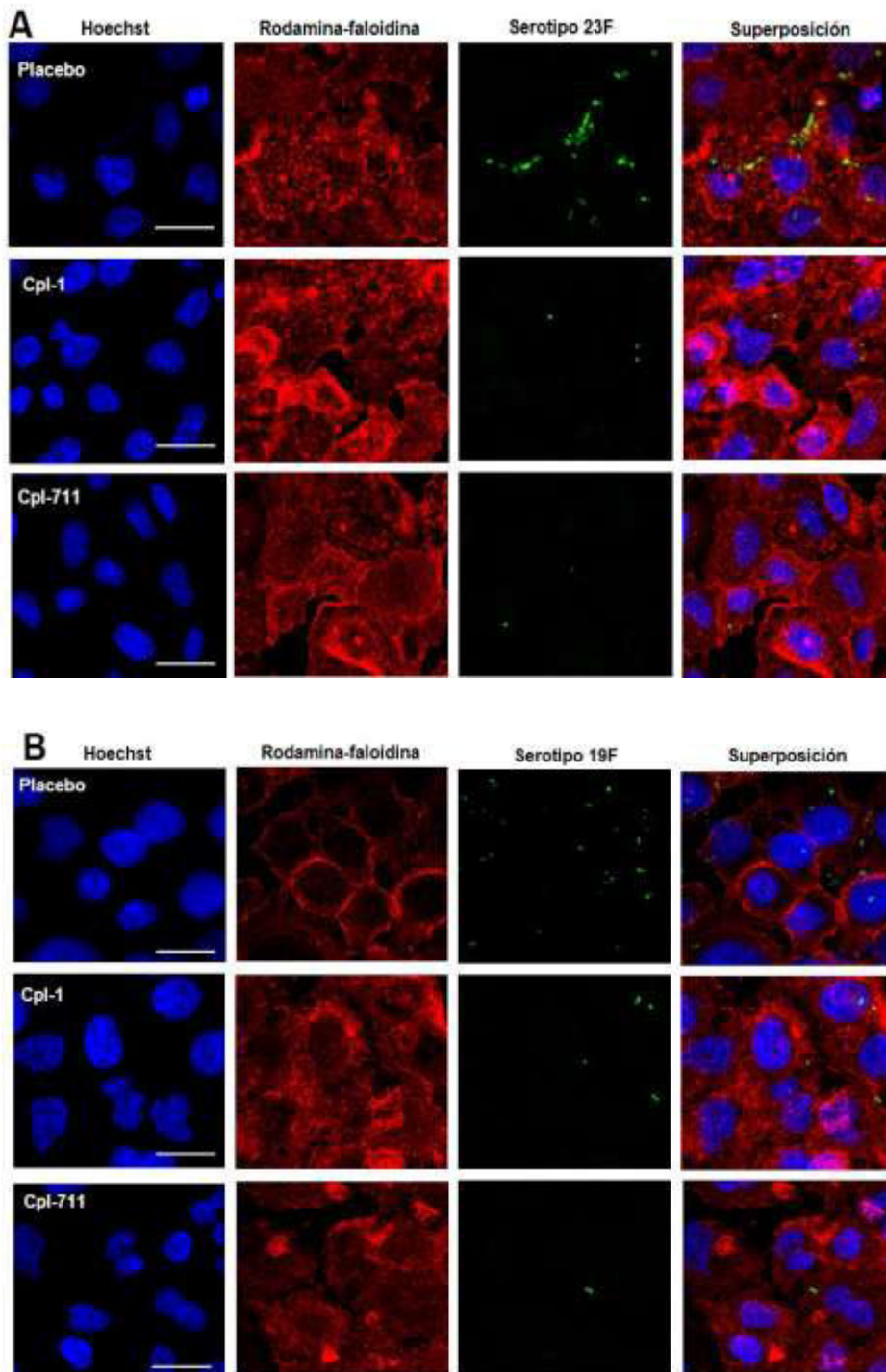


Figura 22. Efecto antimicrobiano las enzimas líticas Cpl-1 y Cpl-711 frente a los aislados de neumococo colonizando células humanas del epitelio de pulmón. La línea celular A549 fue infectada con el aislado de serotipo 23F (A) o 19F (B) y tratadas con PBS como placebo o con 10 µg/ml de Cpl-1 o Cpl-711. Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal. El ADN celular aparece de color azul mediante tinción con Hoechst, el citoesqueleto de actina se visualizó en rojo mediante tinción con rodamina-faloidina y las cepas bacterianas se marcaron con el fluorocromo FAM-SE. Las barras equivalen a 25 µm.

2.5. Papel de los enzibióticos del estudio para reducir el estado de portador en un modelo animal de colonización de nasofaringe

Basándonos en los resultados de actividad bactericida *in vitro* mencionados en el apartado anterior, el siguiente objetivo consistió en validar la capacidad de estos compuestos para eliminar la bacteria adherida al tracto respiratorio utilizando un modelo experimental murino. Para ello, se optó por un modelo murino de colonización que es ampliamente utilizado para neumococo y otras bacterias presentes en la microbiota de la nasofaringe (Briles *et al.*, 2005; Doehn *et al.*, 2013; Hernani Mde *et al.*, 2011).

La erradicación o incluso la reducción del estado de portador es probable que tenga un claro impacto en la transmisión de cepas multirresistentes de *S. pneumoniae* y, por consiguiente, en la incidencia de ENI. Con este propósito, se utilizaron los aislados clínicos de serotipo 19F y 23F ya que poseen resistencia antibiótica a múltiples antimicrobianos, y se analizó la capacidad de los enzibióticos Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S así como la AMX como antibiótico convencional para reducir la colonización de la nasofaringe producida por estos dos aislados clínicos (Figs. 23 y 24). En una primera aproximación científica, grupos de ratones fueron infectados por vía IN con una dosis elevada de la cepa de serotipo 23F (Fig. 23) en un volumen de 10 μ l que es el adecuado para obtener colonización prolongada de la nasofaringe sin que el microorganismo acceda al tracto respiratorio inferior (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). A las 40 horas después de la colonización, los animales fueron tratados por vía intranasal con PBS (como placebo) o con 10 μ g por ratón de Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S, y 6 h más tarde, los animales fueron sacrificados y se obtuvo el lavado de la nasofaringe para el recuento de viables (Fig. 23.)

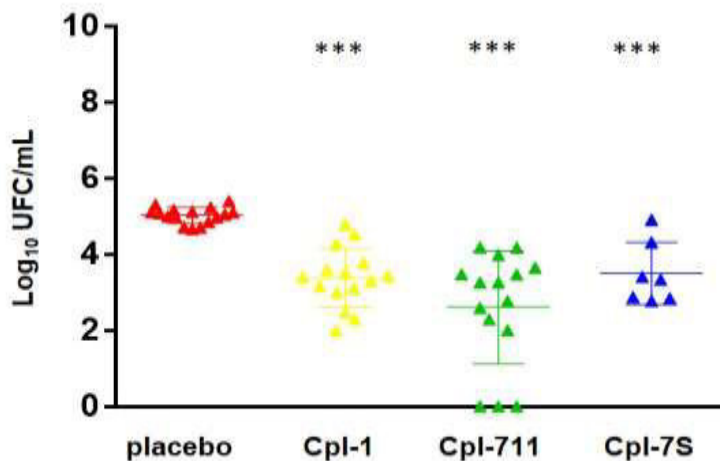


Figura 23. Actividad antimicrobiana de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S en un modelo murino de colonización de nasofaringe. Los ratones fueron infectados con el aislado clínico del serotipo 23F. Los resultados se expresan como recuentos bacterianos obtenidos a partir del lavado nasofaríngeo. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos en comparación al grupo placebo como control (test *t* de Student de dos colas; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

La administración de una única dosis de estos enzibióticos redujo significativamente el nivel de colonización en comparación con el grupo control (placebo), demostrando la actividad bactericida de estos compuestos y su eficacia para la eliminación de bacterias unidas al tracto respiratorio superior en condiciones *in vivo* (Fig. 23). Entre las tres enzimas líticas, tan sólo Cpl-

711 fue capaz de erradicar completamente el estado de portador en un 20% de los ratones, confirmando que este enzibiótico fue el más efectivo eliminando la bacteria que coloniza la nasofaringe (Fig. 23).

Con el fin de confirmar estos resultados y conocer si este efecto bactericida en la nasofaringe podría extenderse a otros aislados, se analizó la capacidad de estos enzibióticos para eliminar el estado de portador utilizando el aislado multirresistente de serotipo 19F y, además, se incluyó AMX para comparar la eficacia antimicrobiana de los enzibióticos con un antibiótico de amplio espectro y de uso común frente a las infecciones respiratorias. Se investigó el tratamiento, con una única dosis de las enzimas líticas o el antibiótico AMX siguiendo el esquema de inoculación descrito anteriormente (Fig. 24). También se probó una estrategia diferente consistente, en administrar tres tratamientos sucesivos con 10 µg por ratón de Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S y AMX, a las 24h, 48 h y 72h (Fig. 25). A las 6 h del último tratamiento (bien con una única administración de compuestos o bien con tres dosis), los animales fueron sacrificados y se obtuvo el lavado de la nasofaringe para el recuento de viables, tal como se muestran en las figuras 24 y 25.

Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con 10 µg por ratón de AMX no afectó a los niveles de bacteria en la nasofaringe, en ambos casos, independientemente de si se administró una única dosis (Fig. 24) o 1 dosis diaria durante 3 días (Fig. 25). Sin embargo, el tratamiento con las enzimas líticas permitió una reducción de los niveles de bacteria adheridos a la nasofaringe de manera significativa en comparación al placebo y al grupo de animales tratados con AMX (Figs. 24 y 25).

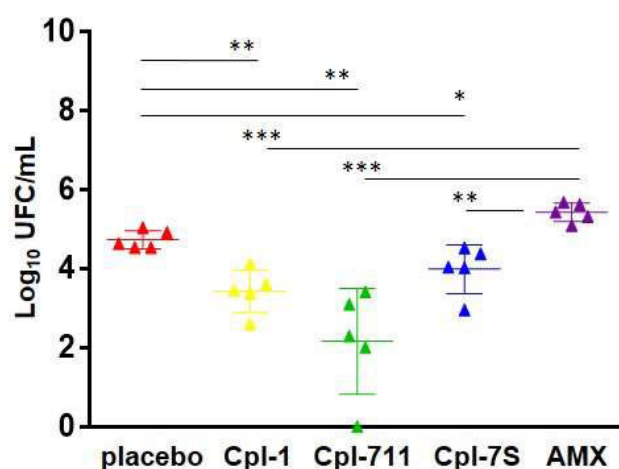


Figura 24. La actividad terapéutica de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S y antimicrobiana amoxicilina en un modelo murino de colonización de nasofaringe. Los ratones fueron infectados con el aislado clínico del serotipo 19F. Se administró por vía intranasal una única dosis de 10 µg/ml de las diferentes enzimas líticas o el antibiótico AMX a las 40 h post infección (PBS como placebo). Las barras de error representan las desviaciones estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test t de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) comparando los resultados obtenidos con las enzimas líticas del estudio frente al grupo placebo o entre los diferentes tratamientos.

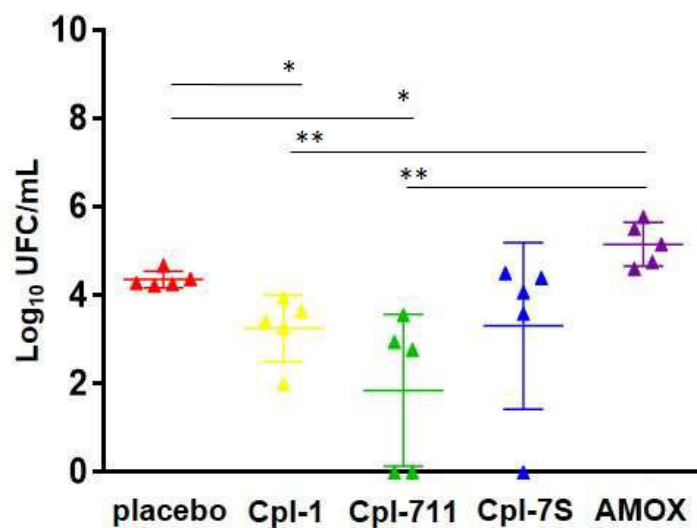


Figura 25. La actividad terapéutica de las enzimas líticas Cpl-1, Cpl-711 y Cpl-7S y antimicrobiana amoxicilina en un modelo murino de colonización de nasofaringe. Los ratones fueron infectados con el aislado clínico del serotipo 19F. Se administró por vía intranasal una dosis de 10 µg/ml de las diferentes enzimas líticas o el antibiótico AMX (PBS como placebo) a diferentes tiempos post-infección (24h, 48h y 72h). Los resultados se expresan como recuentos bacterianos obtenidos a partir del líquido del lavado nasofaríngeo. Las barras de error representan las desviaciones estándar y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test t de Student de dos colas; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) comparando los resultados obtenidos con las enzimas líticas del estudio frente al grupo placebo o entre los diferentes tratamientos.

En general, de las tres enzimas líticas, el compuesto Cpl-711, fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana en términos de reducción de los niveles de bacteria en la nasofaringe tanto para el aislado clínico de serotipo 23F como para el de serotipo 19F (Figs. 24 y 25).

2.6. Combinación de enzimas líticas y antibióticos frente a la enfermedad neumocócica invasiva

El siguiente y último objetivo que se planteó en esta Tesis Doctoral consistió en analizar el efecto terapéutico al combinar la administración de dosis no protectoras de enzimas líticas con dosis no protectoras de un antibiótico comercial con el fin de estudiar el posible efecto sinérgico o aditivo de esta combinación. Para ello, se seleccionó la enzima lítica Cpl-711 que era la que mejores resultados había mostrado en los estudios descritos hasta el momento y como antibiótico comercial de amplio espectro se seleccionó la cefotaxima (CTX) ya que es el antibiótico de elección en el caso de ENI a nivel hospitalario. Como modelo murino de infección invasiva se estudió la sepsis neumocócica ya que es un modelo reproducible y ampliamente utilizado por diferentes laboratorios en todo el mundo. El aislado de neumococo que se seleccionó fue la cepa multirresistente de serotipo 23F.

Para realizar este objetivo, se inocularon 4 grupos de al menos 10 animales cada uno de la estirpe BALB/c por vía intraperitoneal (ip) conteniendo 10^7 UFC por ratón de la cepa 23F de *S. pneumoniae*. Una hora después de la infección, se administraron diferentes tratamientos, incluyendo un grupo control placebo al que se le administró PBS por vía ip y 3 grupos de animales tratados con los compuestos con actividad antimicrobiana (Fig. 26). De estos 3 grupos, uno recibió una dosis subterapéutica de CTX (25 mg/kg), otro grupo recibió una dosis

no protectora de Cpl-711 (4 µg/ratón) y el tercer grupo recibió la combinación de ambos compuestos. La supervivencia de cada grupo experimental se monitorizó diariamente, determinando los niveles de bacteria en sangre a las 24h, así como los registros de mortalidad y supervivencia durante un periodo de 7 días (Fig. 26).

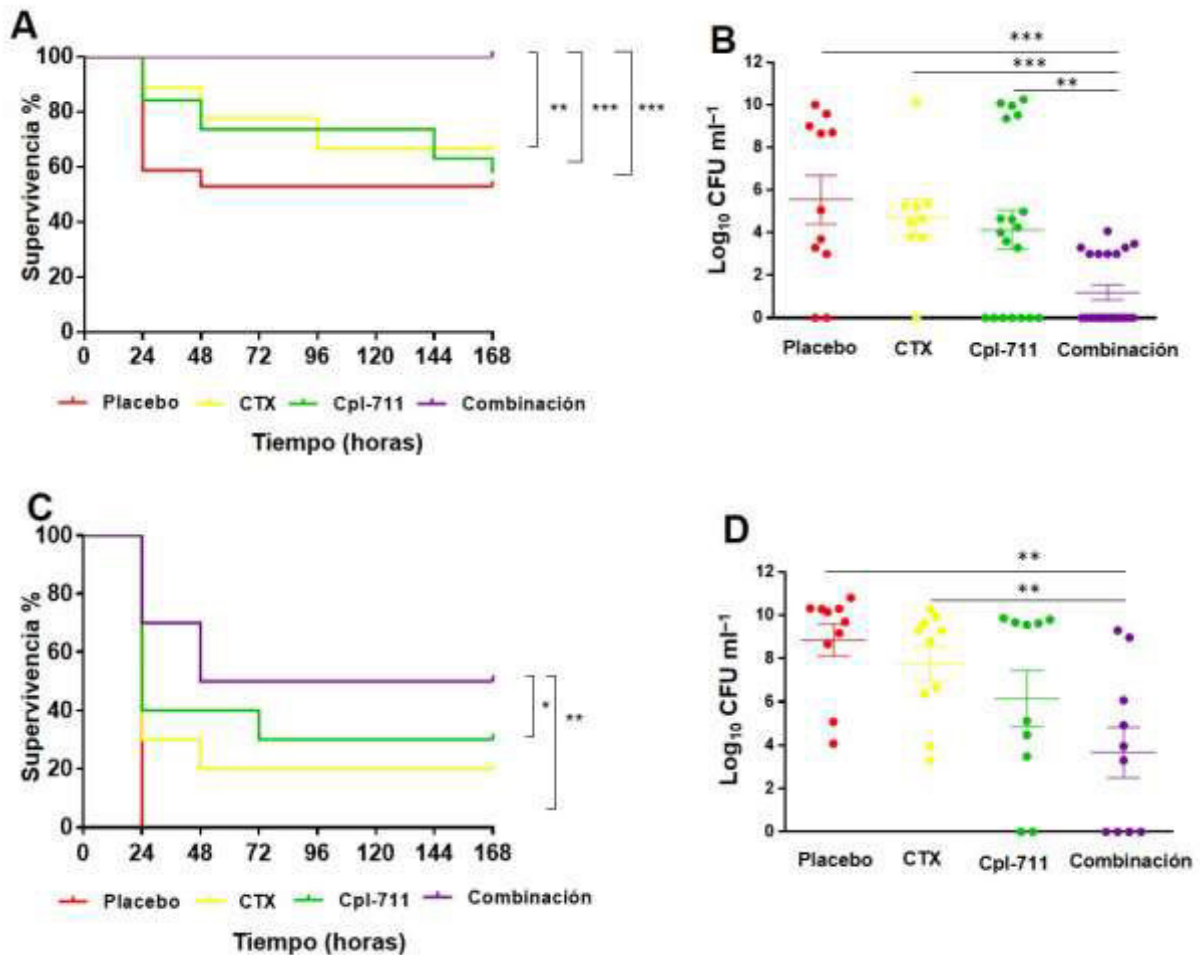


Figura 26. Curvas de supervivencia tras la administración de la enzima lítica Cpl-711 y el antibiótico CTX en un modelo murino de sepsis neumocócica. (A) Supervivencia a lo largo de 7 días. La línea roja corresponde a la supervivencia de los ratones tratados con PBS como placebo. La línea amarilla representa a la supervivencia de los ratones tratados con 25 mg/kg de CTX. La línea verde corresponde a la supervivencia del grupo de ratones tratados con 4 µg de la enzima Cpl-711. La línea morada corresponde a la supervivencia obtenida del tratamiento combinado de 25 mg/kg de CTX y 4 µg de Cpl-711. (B) Recuentos bacterianos en sangre a las 24h, de los ratones tratados con PBS como placebo (círculos rojos), ratones tratados con 25 mg/kg de CTX (círculos amarillos), animales tratados con 4 µg de la enzima Cpl-711 (círculos verdes) y tratamiento combinado de 25 mg/kg de CTX y 4 µg de Cpl-711 (círculos morados). Los asteriscos representan los resultados que son estadísticamente significativos comparando la terapia combinada de CTX y Cpl-711 frente a los tratamientos individuales y al grupo placebo (test de Mantel Cox para la supervivencia y test t de Student de dos colas para comparar los recuentos bacterianos; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Los tratamientos individuales con CTX o Cpl-711 no aumentaron de forma significativa la supervivencia a los 7 días, aunque sí que retrasaron la muerte de los animales en comparación al grupo no tratado (placebo) (Fig. 26A). Sin embargo, la combinación de CTX y Cpl-711 fue totalmente protectora, tal como se muestra en la figura 26A. El tratamiento combinado con CTX y Cpl-711 redujo de forma significativa los niveles de bacteria en sangre en comparación de los animales tratados con los compuestos individuales (Fig. 26B). Además, la terapia combinada

erradicó la bacteria por completo a las 24 h en mayor proporción que los tratamientos individuales (Fig. 26B).

También se estudió la protección de la terapia combinada en un modelo murino de sepsis utilizando una dosis infectiva mayor del serotipo 23F siendo de 10^8 CFU/ml (Figs. 26 C y D). En este caso, el grupo placebo murió de manera fulminante en las primeras 24 h (Fig. 26C). En el grupo de animales a los que se les administró la combinación de CTX y Cpl-711, la supervivencia fue mayor que la conferida por los tratamientos por separado (Fig. 26C). Además, la terapia combinada redujo de manera significativa los niveles de bacteria en sangre en las primeras 24h en comparación al grupo no tratado y a los tratamientos individuales, eliminando por completo la bacteria en sangre en un porcentaje elevado de los animales (Fig. 26D).

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

S. pneumoniae es uno de los patógenos más importantes responsables de enfermedades graves asociadas con una alta mortalidad y morbilidad en todo el mundo. La ENI producida por este patógeno ocurre cuando los microorganismos que colonizan la nasofaringe acceden al espacio alveolar y al torrente sanguíneo, causando neumonía y sepsis, o cuando atraviesan la barrera hematoencefálica, produciendo meningitis (Kadioglu *et al.*, 2008; van der Poll y Opal, 2009). La eliminación de neumococo de la circulación sistémica depende completamente de la opsonización llevada a cabo por la fagocitosis y los componentes del sistema del complemento (Bogaert *et al.*, 2004). Tanto la cápsula neumocócica como otros componentes bacterianos son importantes en distintas etapas de la patogénesis de la enfermedad causada por *S. pneumoniae* (Kadioglu *et al.*, 2008), participando todos ellos en la evasión del reconocimiento por parte del sistema del complemento y de la fagocitosis. La identificación y posterior análisis de los productos implicados en la colonización, inflamación e invasión son la clave para determinar la interacción del patógeno con el hospedador.

La búsqueda de tratamientos efectivos en la lucha contra las enfermedades infecciosas ha sido, desde hace muchos años, uno de los principales retos de la humanidad. Hasta que no se descubrieron los antibióticos se disponía de pocas armas para combatir los agentes infecciosos. En la última década del siglo XIX, se utilizaron terapias basadas en anticuerpos para tratar las infecciones (Casadevall, 1996) y, en los años veinte del pasado siglo, la sueroterapia se utilizó frente a numerosas infecciones bacterianas, incluyendo las producidas por *S. pneumoniae*. (Casadevall y Scharff, 1995). Estos tratamientos consiguieron reducir, en un 50%, la mortalidad ocasionada por este patógeno (Casadevall y Scharff, 1994). Sin embargo, cuando apareció la quimioterapia antibiótica, a mediados de la década de los treinta del pasado siglo, se abandonó la sueroterapia y se sustituyó por el tratamiento antibiótico, debido a su mayor efectividad y menor toxicidad.

Las medidas preventivas y terapéuticas frente a la infección producida por *S. pneumoniae* han modificado las resistencias de este patógeno. La PCV7, que incluía los CPS de los principales serotipos responsables de ENI y no susceptibles a PEN, ERY o ambos, se licenció a principios del presente siglo para la inmunización de la población infantil. El uso generalizado de esta vacuna conllevó una disminución drástica de la incidencia de la enfermedad neumocócica causada por los serotipos incluidos en ella y redujo la prevalencia creciente de los serotipos de neumococo no susceptibles a PEN. Como consecuencia de ello, la PCV7 produjo un marcado efecto en la epidemiología de los aislados clínicos obtenidos de adultos, los cuales indirectamente, también se beneficiaron de la vacunación de la población infantil (Fenoll *et al.*, 2009a). La introducción de la vacuna PCV13 permitió una disminución de la infección producida por los serotipos incluidos en esta vacuna, al igual que ocurrió con la PCV7 (Miyaji *et al.*, 2013), pero está subiendo la prevalencia de otros serotipos no incluidos en dichas vacunas. Este es el caso de los aislados de serotipo 8 que están aumentando en todo el mundo y además tienen la particularidad que muchos de ellos presentan elevada resistencia a fluoroquinolonas (Duvvuri *et al.*, 2016; Rodríguez-Avial *et al.*, 2011). Otro ejemplo es el de los serotipos 11A, 15A, 15B, 23A y 35B que están asociados a multirresistencia antibiótica, algunos de ellos con altas tasas de resistencia a antibióticos β -lactámicos, lo que puede poner en peligro el éxito de los posibles tratamientos antibióticos en caso de que los pacientes sufran un episodio grave de ENI producida por alguna de estas cepas multirresistentes (Aguinagalde *et al.*, 2015; Choe *et al.*, 2016; Olarte *et al.*, 2016).

Las cepas utilizadas en el presente estudio (las denominadas como 48, y 69; (Tabla 2) se seleccionaron no sólo por poseer los serotipos incluidos en las vacunas PCV7 y PCV13 sino, también, por sus altos niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los que destacaban los β -lactámicos y los macrólidos (Soriano *et al.*, 2008). De hecho, un estudio reciente ha identificado a los aislados clínicos de los serotipos 19F y 23F como importantes factores de riesgo en la mortalidad producida por la ENI (Luján *et al.*, 2010). Por otro lado, se seleccionó un aislado clínico de serotipo 3 ya que, aunque está incluido en la PCV13 y es un serotipo susceptible a la mayoría de los antibióticos, tiene la peculiaridad de presentar una cápsula de elevado grosor que dificulta la capacidad opsonizante de los anticuerpos específicos. Esta característica confiere a las cepas de este serotipo una ventaja intrínseca para evadir la fagocitosis mediada por la activación del complemento inducida por la presencia de inmunoglobulinas anticapsulares, de modo que, sigue siendo un serotipo muy frecuente en ENI a pesar de estar incluido en la vacuna PCV13 (Fenoll *et al.*, 2015; Poolman *et al.*, 2009). Este aspecto es importante desde el punto de vista profiláctico ya que, en ausencia de tratamiento antibiótico, el desenlace de la infección depende completamente del balance de las interacciones entre los factores de virulencia bacterianos y los mecanismos de defensa del hospedador. La eliminación de neumococo de la circulación sistémica depende de la opsonización por el sistema de complemento y su posterior fagocitosis (Bogaert *et al.*, 2004; van der Poll y Opal, 2009). Debido a ello, la introducción de medidas preventivas, como puede ser la inclusión de nuevas estrategias de vacunación frente a neumococo, puede suponer un gran avance en la lucha frente a las infecciones producidas por este patógeno.

En este sentido, existe un gran interés en la búsqueda y caracterización de proteínas de neumococo como posibles candidatas a vacuna ya que pueden ofrecer como gran ventaja, la de evitar las limitaciones de las actuales vacunas frente a *S. pneumoniae* basadas en polisacáridos capsulares. Las principales características para que una proteína pueda considerarse como potencial candidata a vacuna frente a neumococo es que esté expuesta en la superficie del patógeno, induzca una elevada inmunogenicidad, esté conservada entre la amplia biodiversidad de neumococo, o al menos, entre los serotipos que sean clínicamente más importantes, y por último, que sea capaz de proporcionar una respuesta inmune protectora. Si, además, de todo lo anterior, la proteína candidata juega también un papel importante en la virulencia del microorganismo, esta circunstancia sería muy beneficiosa ya que sugeriría que la proteína de elección, se expresa y es fisiológicamente activa durante el proceso de infección sistémica. Otro aspecto destacable en la identificación de este tipo de antígenos vacunales, es que los genes que codifican estas proteínas suelen ser necesarios para la supervivencia de neumococo en el hospedador, por lo que raramente podrán sufrir mutaciones que puedan afectar a su variabilidad antigénica entre los distintos aislados clínicos. Además, la utilización de este tipo de proteínas como antígenos candidatos a vacuna, deberían tener como principal característica la de ser capaces de inducir inmunidad que ayude a prevenir el proceso de evasión de la respuesta inmune por *S. pneumoniae*. En este sentido, diversas proteínas neumocócicas están siendo caracterizadas en los últimos años como candidatas a vacuna con el objetivo de superar las limitaciones de las actuales vacunas basadas en polisacáridos capsulares (Daniels *et al.*, 2010; Denoel *et al.*, 2011; Feldman y Anderson, 2014). La inmunización simultánea de varias proteínas de neumococo siendo la mayoría de ellas, proteínas de superficie, ha mostrado ser una estrategia capaz de proporcionar cierto grado de protección en modelos murinos frente a la neumonía neumocócica y la infección sistémica (Briles *et al.*, 2003; Briles *et al.*, 1997; Briles *et al.*, 1996; Brown *et al.*,

2001b). De este modo, el desarrollo de una vacuna que contenga varios antígenos proteicos debería proporcionar como principal ventaja, la de incrementar la eficacia protectora inducida por las proteínas de forma independiente, así como la de aumentar el espectro de cobertura en cuanto a serotipos o aislados clínicos diversos sobre los que protegería (Feldman y Anderson, 2014).

En esta Tesis Doctoral hemos caracterizado la respuesta inmunológica, así como el efecto protector de la hidrolasa de pared celular LytB, como una prometedora vacuna proteica frente a las infecciones producidas por *S. pneumoniae*. LytB pertenece a la familia de proteínas de unión a colina en las que varios miembros incluyendo PspA, PspC, PcpA y LytA, han sido propuestas por otros autores como posibles antígenos candidatos a vacuna (Feldman y Anderson, 2014; Yuan *et al.*, 2011b). De entre estas proteínas, PspA y LytA son proteínas que presentan cierto polimorfismo, habiéndose descrito hasta 3 familias diferentes dentro de la proteína PspA (Roche *et al.*, 2003) y algunas variaciones alélicas en la proteína LytA (Morales *et al.*, 2010), lo que podría afectar a su inmunogenicidad y capacidad protectora (Whatmore y Dowson, 1999). Esta variabilidad es todavía mucho más dramática para PspC de la que se han descrito una alta divergencia genética, habiéndose identificado numerosas familias lo que hace que sea una proteína altamente polimórfica (Iannelli *et al.*, 2002). Estas diferencias genéticas dentro de PspC afectan a la proteína desde el punto de vista inmunogénico (Briles *et al.*, 1997) y también a nivel de patogénesis ya que la capacidad de neumococo para evadir la inmunidad del complemento puede variar de forma muy notable en función del tipo de PspC que contenga el aislado clínico (Yuste *et al.*, 2010a).

En este sentido, la proteína que se ha caracterizado en esta Tesis Doctoral, la glucosaminidasa LytB, a pesar de mostrar cierto polimorfismo en el número de repeticiones de unión a colina es una proteína que se encuentra bien conservada entre los aislados clínicos de *S. pneumoniae* (Moscoso *et al.*, 2005). El análisis en detalle de las secuencias de LytB de los dos aislados clínicos de este estudio correspondientes a los serotipos 3 y 23F, se compararon con las secuencias de LytB de las cepas de referencia D39 y TIGR4 (Fig. 17). Nuestros resultados demostraron que el aislado clínico del serotipo 3 carece de dos repeticiones de unión a colina, siendo por lo tanto diferente, a las proteínas LytB de las cepas 48 (serotipo 23F) y D39 (serotipo 2), que son de hecho muy similares entre ellas.

Un factor adicional que influye de manera significativa en la generación de una respuesta inmune adecuada frente a un antígeno determinado, es la presencia de adyuvantes. Estos compuestos, en el contexto de las vacunas, se definen como aquellos componentes capaces de mejorar y potenciar la respuesta antígeno-anticuerpo (Reed *et al.*, 2013). Los adyuvantes pretenden aumentar la inmunogenicidad de antígenos altamente purificados o recombinantes y así poder reducir la cantidad de antígeno y el número de inmunizaciones necesarias. De esta forma se puede aumentar la eficacia de las vacunas en recién nacidos, ancianos y personas inmunocomprometidas. Además, promueven la inducción de inmunidad en mucosas y potencian la inmunidad celular, aumentando los títulos de anticuerpos funcionales con actividad bactericida, neutralizante u opsonizante (Reed *et al.*, 2013). Sin duda, los trabajos más extensos sobre la importancia de los adyuvantes se deben a Freund, quien en 1937 descubre los efectos inmunopotenciadores del bacilo tuberculoso inactivado combinado con aceite de parafina (Opie y Freund, 1937). La utilización de adyuvantes en vacunas en el momento actual no está exenta de polémicas. En este sentido y desde un punto de vista teórico, el adyuvante ideal no debe ser tóxico, debe estimular la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, debe promover la respuesta inmunológica a largo plazo, lo que se denomina como memoria

inmunológica, no debe inducir autoinmunidad, no debe ser mutagénico, carcinogénico o teratogénico, no debe ser pirógeno y debe ser estable en condiciones de temperatura, pH y tiempo. Los adyuvantes que se utilizan actualmente en las vacunas humanas comercializadas, incluyen las sales de aluminio, las emulsiones oleoacuosas (MF59, AS09 y AF03), virosomas, el adyuvante AS04 así como oligodesoxinucleótidos con secuencias CpG por citar algunos (Reed *et al.*, 2013).

En la presente Tesis Doctoral, el proceso de inmunización se llevó a cabo utilizando Alhydrogel[®] que contiene hidróxido de aluminio (Alum) como adyuvante, o bien la proteína LytB en presencia de Alhydrogel[®] en proporción 1:1. La elección de este adyuvante fue debida a que está aprobada su utilización en seres humanos como puede confirmarse por algunos estudios en los que se ha evaluado la respuesta inmunológica de determinadas proteínas neumocócicas candidatas a vacuna en humanos (Bologa *et al.*, 2012; Kamtchoua *et al.*, 2013). Las sales de aluminio utilizadas como adyuvantes, convierten los antígenos solubles en partículas con un diámetro inferior a 10 μm , que son captadas por las células presentadoras de antígeno. Además, las sales de aluminio activan el complemento, estimulan los linfocitos B, linfocitos CD4 y CD8, los macrófagos, regulan las señales de coestimulación en monocitos y promueven la liberación de IL-4. Otro aspecto importante a destacar se basa en que la administración de sales de aluminio, al inducir inflamación en el sitio de inyección, atrae células presentadoras de antígeno y potencia de esta forma la respuesta inmune. Como contrapartida habría que tener en cuenta que las sales de aluminio no estimulan las respuestas Th1, la secreción de IFN- γ , ni la producción de IgG2 por los linfocitos B. En cambio, estimulan la respuesta Th2, la secreción de IL-5 y la producción de IgG1 e IgE (Coffman *et al.*, 2010; Marrack *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2013). Por todo ello, las reacciones adversas más frecuentemente relacionadas con el uso de sales de aluminio como adyuvante son las reacciones locales del tipo de eritema, formación de granulomas o nódulos subcutáneos.

La vacunación de ratones BALB/c con la proteína LytB en presencia de Alum indujo una fuerte respuesta de inmunoglobulinas de diferentes subclases incluyendo IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, así como niveles moderados de IgA. Esta respuesta generada tras la inmunización con LytB es de gran interés desde el punto de vista inmunológico ya que muchas de estas subclases son producidas por las actuales vacunas antineumocócicas como la vacuna PPSV-23 y las PCVs (Rosado *et al.*, 2013). En este sentido, cabe destacar que la respuesta de anticuerpos conferida por la vacuna PPSV-23 es predominantemente de la subclase IgG2 (Lottenbach *et al.*, 1999; Uddin *et al.*, 2006). La magnitud de la respuesta de inmunoglobulinas proporcionada por las PCVs varía según el serotipo, la formulación de la vacuna y la edad (Kamboj *et al.*, 2003). En adultos, las PCVs inducen principalmente una respuesta de tipo IgG2, mientras que, en los niños, la respuesta predominante es de la subclase IgG1 (Lottenbach *et al.*, 1999; Shelly *et al.*, 1997; Wuorimaa *et al.*, 2001). Los resultados de esta Tesis Doctoral confirman que la inmunización con LytB resultó exitosa como proteína candidata a vacuna porque estimuló la producción de diferentes subclases de inmunoglobulinas incluyendo IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. No obstante, desde el punto de vista funcional, las subclases de IgG generadas fueron relevantes ya que las inmunoglobulinas de tipo IgG1 e IgG3 son muy eficaces activando la inmunidad del complemento y presentan una mayor capacidad para unirse al receptor Fc γ de células fagocíticas que las IgG2 (Amir *et al.*, 1990; Bredius *et al.*, 1992; Soininen *et al.*, 1999).

En este sentido, los resultados obtenidos confirmaron que la vacunación con LytB permitió obtener elevados niveles de estas inmunoglobulinas sugiriendo que los anticuerpos frente a

esta proteína podrían ser capaces de activar la fagocitosis mediada por el sistema del complemento. Es importante matizar que existen diferencias en los niveles de expresión de diferentes subclases de IgGs entre humanos y ratones. De hecho, es difícil correlacionar de un modo claro, la funcionalidad de determinados subtipos de IgG entre las diferentes especies ya que no son directamente equivalentes (Mestas y Hughes, 2004). Sin embargo, a pesar de la dificultad que supone comparar los hallazgos derivados de modelos murinos en cuanto a respuesta de IgG, con los obtenidos en humanos, este tipo de estudios realizados en animales pueden ser de gran utilidad a la hora de caracterizar nuevos antígenos proteicos para el desarrollo de vacunas, ya que permiten incrementar nuestro conocimiento de los mecanismos inmunológicos de protección frente a la ENI.

Una de las principales consecuencias debidas a la producción de anticuerpos específicos generados por una determinada proteína, es la activación de la inmunidad mediada por el sistema del complemento, así como la inducción posterior de la fagocitosis inducida por células fagocitarias profesionales (Walport, 2001b). Uno de los principales objetivos planteados en esta Tesis Doctoral consistió en estudiar si los anticuerpos frente a LytB podrían ser funcionales en términos de estimulación de la respuesta inmune. Para ello, se analizó la activación del complemento en la superficie de diferentes aislados clínicos de neumococo demostrando que los anticuerpos generados frente a la proteína LytB fueron capaces de activar el reconocimiento por C1q activando la vía clásica del complemento. Esta activación es crítica desde la perspectiva inmunológica frente a la infección neumocócica ya que esta vía es esencial para la activación de la inmunidad del complemento tanto en ratones como en humanos (Brown *et al.*, 2002b; Yuste *et al.*, 2008b). Además, los anticuerpos generados fueron capaces de inducir el depósito de la proteína C3b del sistema del complemento en ambos aislados clínicos de neumococo, siendo más notable frente al serotipo 23F. Estos hallazgos contribuyen de manera exitosa a un efecto protector de la proteína y sugieren que las diferencias observadas en los niveles de reconocimiento por el sistema del complemento en los distintos aislados bacterianos, podría deberse a la naturaleza y composición química del polisacárido capsular bacteriano (Brown *et al.*, 1983).

Entre los principales mecanismos celulares de defensa del hospedador frente a neumococo se encuentra la opsonofagocitosis del microorganismo (Standish y Weiser, 2009; van der Poll y Opal, 2009) siendo los neutrófilos los que juegan un papel predominante en la respuesta inmune frente a las infecciones por este patógeno. De hecho, pacientes con neutropenia presentan una marcada susceptibilidad a la infección neumocócica y un elevado riesgo de padecer infecciones recurrentes por esta bacteria lo que demuestra la importancia de los neutrófilos en la infección por *S. pneumoniae*. (Johansson *et al.*, 1992; Zuluaga *et al.*, 2006). Con el fin de analizar el efecto de los anticuerpos anti-LytB en el proceso de opsonofagocitosis, se utilizó la línea celular HL- 60 diferenciada a neutrófilos. La opsonización con sueros procedentes de animales inmunizados con LytB incrementó la fagocitosis mediada por el sistema del complemento confirmando que los anticuerpos generados frente a la proteína LytB son capaces de activar el proceso de fagocitosis frente a *S. pneumoniae*. Además, el hecho de que se generara una respuesta de tipo IgG3 tras la inmunización con LytB puede ser relevante frente a la infección sistémica, ya que esta inmunoglobulina es altamente protectora evitando la ENI (Briles *et al.*, 1981).

Otra posible explicación para este mayor aumento de la fagocitosis en presencia de anticuerpos específicos frente a LytB podría deberse a cambios morfológicos inducidos en la bacteria por estos anticuerpos. Esto es importante porque LytB es una proteína esencial para la

separación de células hijas al final de la división celular, como se ha podido comprobar utilizando mutantes en LytB que forman cadenas largas, en lugar de la morfología típica de diplococos que es habitual en *S. pneumoniae* (De las Rivas *et al.*, 2002; García *et al.*, 1999b). La alteración de la morfología inducida por la presencia de anticuerpos frente a LytB confirmaría estudios previos de otros autores en los que la formación de cadenas en neumococo a través de la aglutinación mediada por anticuerpos, favorece el reconocimiento y la fagocitosis mediada por el sistema del complemento (Dalia y Weiser, 2011). Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral confirman esta hipótesis, ya que los anticuerpos frente a LytB indujeron un incremento en el tamaño bacteriano favoreciendo el encadenamiento de los neumococos, lo que es compatible con una mayor susceptibilidad a la fagocitosis a través del sistema del complemento y una menor virulencia de la bacteria (Dalia y Weiser, 2011; Rodríguez *et al.*, 2012).

Una vez demostrada la inmunogenicidad de LytB como proteína candidata vacuna, se caracterizó su capacidad protectora en modelos de neumonía y sepsis neumocócica. Para ello se utilizaron dos aislados clínicos de los serotipos 3 y 23F. El motivo de estudiar la protección mediada por los anticuerpos anti-LytB frente al serotipo 3, es porque sigue siendo responsable de un porcentaje elevado de los casos de ENI tanto en población adulta como infantil a pesar de estar incluido en la vacuna (Fenoll *et al.*, 2015). La inclusión del aislado de serotipo 23F en el estudio fue debida a que es un serotipo asociado a multirresistencia antibiótica con una elevada capacidad para diseminarse por todo el mundo, aunque actualmente, no sea de los más frecuentes debido al efecto protector de las vacunas conjugadas (Kasahara *et al.*, 2005; Liñares *et al.*, 2010). Los resultados de la Tesis Doctoral confirmaron que la vacunación con LytB protegió a los ratones frente a la sepsis y la neumonía neumocócica producida por estos dos aislados clínicos de serotipos 3 y 23F. En ese sentido, la presencia de anticuerpos frente a LytB controló la replicación bacteriana en la circulación sistémica, disminuyendo la severidad del proceso infeccioso producida por estos serotipos. Estos resultados son de gran interés en la protección frente a la ENI producida por el serotipo 3, ya que las tasas de ENI producidas por este serotipo siguen siendo un importante problema de salud pública no sólo en España (Fenoll *et al.*, 2015). sino también, en otros países (Littorin *et al.*, 2016). De hecho, estudios recientes realizados en Suecia, describen al serotipo 3 como responsable del 14% de los aislados invasivos tras la introducción de la vacuna conjugada hace ya 4 años. Además, se ha observado que la proporción de aislados de serotipo 3 responsables de ENI en Suecia ha aumentado en comparación a la época anterior a la introducción de la vacuna.

La posible falta de eficacia frente al serotipo 3 tras la administración de las vacunas conjugadas se ha asociado a una respuesta inmune reducida posiblemente debido al abundante CPS producido por estas cepas (Poolman *et al.*, 2009). Además, otra posible explicación para explicar el fracaso en la protección inducida por la PCV-13 frente a los aislados del serotipo 3, se ha relacionado recientemente con la liberación de fragmentos de CPS por estos aislados de modo que podrían interferir con la muerte mediada por anticuerpos y la protección por anticuerpos anti-CPS (Choi *et al.*, 2016). En relación a estos estudios, los resultados obtenidos confirman que la inmunización con LytB incrementa la fagocitosis mediada por el sistema del complemento, estimulando la eliminación bacteriana en el torrente circulatorio, favoreciendo de este modo, la protección frente a la neumonía y sepsis neumocócica causada por la cepa de serotipo 3.

Los hallazgos derivados de este trabajo sugieren que LytB podría ser considerada una candidata prometedora para el desarrollo de una vacuna proteica frente a neumococo, tal vez,

en un cóctel con otros antígenos como pueden ser combinaciones de proteínas neumocócicas que puedan proporcionar efectos aditivos o sinérgicos lo que claramente sería muy beneficioso (Feldman y Anderson, 2014; Kaur *et al.*, 2014; Ogunniyi *et al.*, 2007). Otra alternativa consistiría en la utilización de LytB como una proteína transportadora para el CPS del tipo 3 en lugar de conjugar este CPS al toxoide diftérico que es el que está presente en las vacunas conjugadas. Esta opción podría ser una estrategia profiláctica para aumentar la inmunogenicidad frente a este serotipo, ya que determinadas combinaciones de proteínas de neumococo conjugadas a algunos CPS están siendo evaluadas recientemente (Odotola *et al.*, 2016). En general, nuestro estudio confirma el posible beneficio que puede ofrecer la proteína LytB como antígeno vacunal frente a la neumonía neumocócica y la enfermedad invasiva.

El segundo gran objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en caracterizar el efecto protector de determinados enzibióticos para eliminar a los neumococos que colonizan el tracto respiratorio superior e inferior. También, se estudió su posible aplicación terapéutica frente a la ENI en combinación con antibióticos de amplio espectro como el caso de la CTX que es un antimicrobiano frecuentemente utilizado en las infecciones por neumococo. El descubrimiento y desarrollo de los antibióticos a principios de la década de 1950, fue uno de los avances científicos más importantes del siglo XX gracias a que han conseguido controlar muchas enfermedades infecciosas y han permitido salvar millones de vidas en todo el mundo.

Sin embargo, en los últimos años y como consecuencia del uso abusivo de los antibióticos, se ha producido un aumento considerable de las cepas multirresistentes lo que ha generado importantes problemas a nivel de salud pública (Putnam *et al.*, 2000). Además, esta situación se ha visto agravada por el cambio estratégico de las prioridades de las grandes compañías farmacéuticas, que se ha traducido en una menor inversión en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos (Talbot *et al.*, 2006). Con este panorama tan poco tranquilizador, la comunidad científica está tratando de encontrar tratamientos alternativos, sobre todo para los patógenos más peligrosos debido a la difusión de las cepas frente a las que se dispone de menor arsenal antibiótico. Como consecuencia de ello, es necesario buscar constantemente nuevas herramientas terapéuticas en la lucha continua contra los microorganismos causantes de patologías de etiología infecciosa y esto probablemente nos lleva al concepto actual de enzibióticos (Veiga-Crespo *et al.*, 2007). Es en este contexto donde se enmarca el renacimiento de la llamada “terapia fágica”, que engloba tanto el uso de bacteriófagos enteros (viriones) como de alguno de sus productos. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y, por tanto, al igual que éstas, su distribución es general en el planeta, incluyendo los ambientes terrestres, acuáticos o cualquier entorno extremófilo donde se ha demostrado la presencia de bacterias. Se ha estimado que puede haber del orden de 10³¹ fagos en la biosfera, clasificados en 13 familias y en unos 30 géneros, distribuidos en cerca de 108 especies distintas (Brüssow y Hendrix, 2002; Rohwer y Edwards, 2002). Los fagos se ingieren regularmente en los alimentos y son colonizadores habituales del intestino humano (Kutter, 2005). Según su ciclo de vida, los fagos se dividen en líticos o virulentos —que producen la lisis de la bacteria a la que infecta— y atemperados, que normalmente se integran en el genoma bacteriano sin inducir la lisis (Weinbauer, 2004). Diversos estudios han demostrado que en el sistema de neumococo las cepas lisógenas representan alrededor del 75% de las muestras analizadas y todos los fagos atemperados analizados hasta la fecha, portaban alelos del tipo *lytA* (Morales, 2014; Ramirez *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2009).

Las lisinas fágicas (endolisinas) son enzimas codificadas por los genomas de fagos, tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, que se sintetizan en el citoplasma bacteriano durante la fase tardía del ciclo lítico, con la finalidad de degradar la pared celular, facilitando así, la liberación de la progenie. Normalmente, estas enzimas no contienen un péptido señal que le facilite su transporte al espacio periplásmico, y así poder acceder al sustrato, por lo que para solventar este inconveniente, los fagos al final de su ciclo lítico, producen proteínas hidrofóbicas de pequeño tamaño denominadas holinas, las cuales forman poros en la membrana citoplásmica que permite a la endolisina pasar a través de ellos y alcanzar el peptidoglicano (Wang *et al.*, 2000). En principio, se podría pensar que las endolisinas podrían añadirse exógenamente a un cultivo bacteriano para acceder a su sustrato y ser capaces de romper los enlaces adecuados, provocando la lisis y la muerte de la bacteria susceptible. Esta idea, aparentemente simple, no se probó con éxito hasta principios de este siglo (Loeffler *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001). Como ya se ha detallado en la Introducción de esta Memoria, las endolisinas se encuentran actualmente englobadas dentro del término “enzibiótico”, inicialmente acuñado para incluir exclusivamente enzimas codificadas por bacteriófagos, que mostraban actividad antibacteriana. En la actualidad, se ha ampliado este concepto para incluir toda clase de enzimas que, independientemente de su origen, presenten actividad antibacteriana y/o antifúngica e incluso antiviral (Veiga-Crespo *et al.*, 2007). El mecanismo de acción de los enzibióticos es distinto del de los antibióticos, ya que, mientras que algunos de éstos interfieren en alguna etapa de la síntesis del peptidoglicano, aquellos catalizan su destrucción (Borysowski *et al.*, 2006). Esto implica que tienen gran efectividad frente a bacterias multirresistentes, como por ejemplo *S. pneumoniae* (Loeffler *et al.*, 2001), *B. anthracis* (Schuch *et al.*, 2002), *S. aureus* (Gilmer *et al.*, 2013), *L. monocytogenes* (Gaeng *et al.*, 2000) o estreptococos del grupo B (Cheng *et al.*, 2005). Además, parece difícil encontrar mutantes resistentes a estas endolisinas pues la baja probabilidad de que esto ocurra está relacionada con que las dianas de los enzibióticos, mediada por sus CWBMs, son estructuras de la pared celular y, más concretamente, del peptidoglicano que es un polímero altamente conservado entre todas las bacterias y, por tanto, difícil de que soporte un cambio estructural que resulte inocuo para la fisiología bacteria (Loeffler *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2002). Así, en el único caso en que se ha descrito el desarrollo de resistencia a un enzibiótico (lisostafina), la bacteria mostró una marcada reducción de su virulencia (Kusuma *et al.*, 2007). Uno de los grandes problemas que podría acarrear el empleo de enzibióticos es la posible respuesta inmunitaria del hospedador frente a este tipo de compuestos. En este sentido se ha demostrado que ratones en los que se les administró diferentes dosis de enzimas, Cpl-1 o MV-L del fago ϕ MR11 de *S. aureus*, produjeron anticuerpos frente a las proteínas, pero, cuando unos días después, los ratones se infectaron con bacterias y se trataron de nuevo con los mismos enzibióticos, éstos mostraron niveles de protección similares a los producidos en los ratones que no habían sido inmunizados con estas enzimas (Jado *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2003; Rashel *et al.*, 2007). Por tanto, los anticuerpos específicos ejercieron poco o ningún efecto neutralizante frente a este tipo de enzimas y no se observaron efectos secundarios ni signos de anafilaxis.

Como ya se ha explicado a lo largo de esta memoria, el uso de enzimas líticas purificadas codificadas por bacteriófagos es una estrategia terapéutica alternativa para la prevención y control de enfermedades causadas por bacterias Gram-positivas, incluyendo *S. pneumoniae* (Fischetti, 2008; Grandgirard *et al.*, 2008; Hermoso *et al.*, 2007; Jado *et al.*, 2003; Witzernath *et al.*, 2009). Aunque la mayoría de los estudios que demuestran el potencial terapéutico de

enzimas líticas, se centran principalmente en el tratamiento de infecciones invasivas graves como sepsis o meningitis (Díez-Martínez *et al.*, 2013; Díez-Martínez *et al.*, 2015; Grandgirard *et al.*, 2008; Jado *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2003), también se ha demostrado su eficacia contra determinadas infecciones asociadas a superficies bióticas o abióticas incluyendo bacterias formando biopelículas asociadas o no a dispositivos médicos (Domenech *et al.*, 2011; Loeffler *et al.*, 2001; McCullers *et al.*, 2007).

Una posible diana para controlar la infección neumocócica mediante el uso de estrategias terapéuticas, podría ser la nasofaringe ya que el proceso de colonización nasofaríngea por neumococo es esencial para el proceso de patogénesis, siendo un requisito fundamental para el desarrollo de ENI (Bogaert *et al.*, 2004; Kadioglu *et al.*, 2008). Por ello, se ha propuesto el uso de ciertos antibióticos para reducir o eliminar el estado de portador nasofaríngeo, aunque el uso de esta estrategia profiláctica a largo plazo, podría contribuir a la aparición de cepas de neumococos no susceptibles (Guillemot *et al.*, 1998; Iwanaga *et al.*, 2015). En teoría, la terapia fágica presenta evidentes ventajas frente a la antibioterapia. Por un lado los antibióticos poseen en general, un espectro de actividad notablemente amplio, mientras que las enzimas líticas tienen la ventaja de poseer un alto grado de especificidad (no comprometiendo de este modo, a la microbiota orofaríngea comensal, que es beneficiosa) (García y López, 2002). Además, estas enzimas líticas son igual de eficaces si se administran sobre bacterias sensibles o sobre patógenos resistentes a múltiples antibióticos y otra ventaja que poseen es que presentan muy baja toxicidad (existen pruebas de la inocuidad de las preparaciones fágicas purificadas), y tienen una probabilidad muy baja de desarrollo de resistencias a las mismas (Fischetti, 2008; Hermoso *et al.*, 2007; Loeffler *et al.*, 2001).

En esta Tesis Doctoral, hemos investigado la actividad antimicrobiana de tres enzimas; como son la enzima lítica Cpl-1 y las dos quimeras sintéticas Cpl-7S y Cpl-711, frente a tres aislados clínicos multirresistentes de *S. pneumoniae*, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de colonización del tracto respiratorio superior e inferior. Las actividades específicas de las diferentes mureín-hidrolasas estudiadas en esta Tesis, tanto naturales como sintéticas, se valoraron mediante ensayos *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana, así como con cultivos de células epiteliales para ver su capacidad para eliminar a los neumococos adheridos al epitelio. Con este método, muy usado en nuestro laboratorio por su sensibilidad y rapidez, se llegó a la conclusión de que las actividades bactericidas de Cpl-7S en comparación a las obtenidas con Cpl-1 y Cpl-711 eran muy diferentes cuando se utilizaron de forma exógena, pues Cpl-7S quedaba muy por debajo de la capacidad letal que mostraba Cpl-1 y Cpl-711. Es importante destacar que la CMI de Cpl-7S fue la más elevada de las tres enzimas líticas, y, por tanto, su menor actividad antimicrobiana para eliminar a los neumococos del tracto respiratorio, podría deberse a estas diferencias. Otra posible explicación a este hecho podría residir en la diferencia en el modo de acceso o en la propia afinidad por el peptidoglicano, ya que Cpl-7S en comparación a las otras, presenta un CWBM diferente. Además, cuando estas enzimas se añaden exógenamente sobre células intactas, la accesibilidad a la diana se podría ver modulada no sólo por el grado de reticulación del muropéptido, la presencia de CPS o los TAs y LTAs, sino también por la carga negativa neta que generalmente confieren estos polímeros a las envueltas de bacterias Gram-positivas. Por tanto, la estructura tridimensional del peptidoglicano y la carga neta que soporta toda la pared celular podrían jugar un papel determinante en el grado de reconocimiento de este tipo de enzimas por su sustrato y, en último término, por la bacteria susceptible (Neuhaus y Baddiley, 2003).

Los resultados obtenidos demuestran que Cpl-1 y Cpl-711, esta segunda enzima con mayor efectividad, son enzimas líticas capaces de reducir la colonización de la nasofaringe causada por cepas sensibles y resistentes a los antibióticos. El hecho de que Cpl-711 mostrara la mayor actividad bactericida de todas ellas y, además, mantuviera el mismo comportamiento frente a cepas con diferente tamaño capsular y con diferente grado de multirresistencia, hace que sea un compuesto antimicrobiano muy prometedor. Lo que resultó más notable e inesperado fue que la capacidad bactericida de Cpl-711 era claramente mayor que la mostrada por la lisozima natural Cpl-1, siendo ésta, una de las enzimas más potentes que se conocían frente a neumococo (Díez-Martínez *et al.*, 2015). Como la única diferencia que hay entre Cpl-711 y Cpl-1 es el módulo catalítico, la primera pista para buscar una explicación estaría entre los 27 residuos diferentes que existen entre ambos módulos. Estas diferencias no afectan a los residuos implicados en la catálisis, ya que éstos se encuentran secuencial y estructuralmente conservados. Las sustituciones no conservativas del módulo catalítico de Cpl-7 con respecto al de Cpl-1 se sitúan, mayoritariamente, al comienzo de las hélices tercera y cuarta y no afectarían a la interacción con el sustrato, de acuerdo con el modelo propuesto para la estructura completa de Cpl-7 y el fragmento de muropéptido que contiene el disacárido pentapéptido (Bustamante, 2009). Por otra parte, la carga neta total de Cpl-711 (-15.82) es algo más negativa que la de Cpl-1 (-14.82) por lo que este factor que tan importante se ha demostrado en el caso de Cpl-7S y otras endolisinas actuaría, en todo caso, en contra de la actividad lítica de la quimera respecto a la enzima natural. Por tanto, no es posible en estos momentos dar una explicación rigurosa del mayor efecto bactericida de Cpl-711 en comparación con Cpl-1 y se necesitarán estudios adicionales para poder resolver esta incógnita. Probablemente, la resolución de las estructuras tridimensionales completas de todas las enzimas implicadas en estas comparaciones, podría aportar interesantes pistas sobre las diferencias de actividad catalítica y/o de unión a sustrato de esta colección de lisozimas.

Desde el punto de vista antimicrobiano en la erradicación del proceso de adhesión celular al epitelio respiratorio, la administración local de estos enzibióticos, mostró actividad bactericida frente a la bacteria que estaba adherida a las células de la nasofaringe, siendo muy eficaces reduciendo el proceso de colonización, lo que podría ser de gran relevancia desde la perspectiva profiláctica. En términos de infecciones respiratorias crónicas, los pacientes con EPOC tienen un elevado riesgo de desarrollar exacerbaciones continuas y episodios recurrentes de ENI (Almirall *et al.*, 2008; Nuorti *et al.*, 2000). La importancia de las infecciones neumocócicas que afectan a pacientes con patologías médicas crónicas como el EPOC, reside en la dificultad de eliminar aislados de neumococo persistentes que residen en su tracto respiratorio inferior (Pelton *et al.*, 2014; Shea *et al.*, 2014). En este sentido, sería razonable que, en un trabajo futuro y siguiendo un enfoque similar al de los inhaladores convencionales para uso humano, la administración de compuestos como Cpl-1 o Cpl-711 por vía intranasal, podría disminuir de manera efectiva, la unión de *S. pneumoniae* a las células epiteliales humanas del pulmón. Este posible enfoque terapéutico, podría ser útil para el pronóstico de la infección en aquellos pacientes que sufren episodios de neumonía recurrente asociada a EPOC u otras condiciones respiratorias crónicas en las que *S. pneumoniae* es uno de los principales agentes etiológicos (Huang *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015).

En general, nuestro estudio aporta un posible beneficio de Cpl-1 y Cpl-711 como agentes antimicrobianos frente a las infecciones neumocócicas que afectan las vías del tracto respiratorio. Estos resultados corroboran observaciones anteriores, en los que se demuestra que la terapia fágica puede ser una estrategia muy atractiva para combatir las infecciones

pulmonares (Abedon, 2015). Como Cpl-1 y Cpl-711 fueron las enzimas líticas bactericidas más eficaces frente a las infecciones neumocócicas asociadas a las superficies celulares, podrían ser compuestos muy prometedores frente a la colonización de las vías respiratorias causada por los aislados clínicos multirresistentes de *S. pneumoniae*. Esta alternativa antimicrobiana también puede ser útil para reducir la propagación de aislados clínicos resistentes a múltiples antibióticos y evitar la transmisión entre los niños que son los principales portadores de *S. pneumoniae* (Bogaert *et al.*, 2006). Además, el uso de estas enzimas puede ser de gran interés terapéutico para eliminar las infecciones respiratorias por neumococo, tanto las persistentes como las recurrentes que afectan a los pacientes con enfermedades crónicas subyacentes.

La posibilidad de utilizar los bacteriófagos de forma terapéutica, conocido genéricamente como “terapia fágica”, ha recibido un renovado interés en los últimos años debido principalmente a las dificultades en el tratamiento de bacterias multirresistentes (Lu y Koeris, 2011). Estos resultados son de gran interés porque la eliminación del estado de portador podría ser beneficiosa para ciertos grupos de riesgo que sufren episodios recurrentes de ENI (Esposito *et al.*, 2016; Hirst y Owusu-Ofori, 2014; Iwanaga *et al.*, 2015; Mwenya *et al.*, 2010; Principi *et al.*, 2016; Turley *et al.*, 2015). La terapia fágica supone tanto el uso de fagos naturales intactos (viriones) como productos derivados de los mismos. Dentro de los posibles fagos a emplear existen dos tipos, los fagos líticos y los atemperados, siendo sólo los primeros buenos candidatos para su uso como agentes terapéuticos. Hay mucha literatura científica sobre el empleo de los viriones como herramienta de control sobre bacterias patógenas causantes de infecciones en las más variadas localizaciones (Lu y Koeris, 2011). Entre otros ejemplos, además de la práctica clínica, se puede citar el uso de los fagos en la industria alimentaria, donde se busca evitar la contaminación de los alimentos (Mahony *et al.*, 2011). El auge de las investigaciones centradas en este tipo de terapia ha hecho que, en la actualidad, sean varias las empresas que específicamente tengan como objetivo la comercialización de diferentes productos derivados de fagos y focalizados en la lucha frente a distintos patógenos en diversos campos como la alimentación, salud, industria ganadera y piscícola, etc. En este sentido, se ha creado recientemente una página web que resume los enzibióticos que han demostrado ser eficaces en experimentos *in vitro* e *in vivo*, y que, además, recopila los enlaces a las diferentes empresas relacionadas con la terapia fágica (<http://www.phibiotics.org/index.php>). En esta página se detalla que dichas empresas están localizadas en Australia, Canadá, EE.UU., India, Israel y varios países de Europa (Francia, Holanda, Portugal y Reino Unido). De las informaciones recogidas en las respectivas páginas web, se puede deducir que el interés de la mayoría de dichas empresas se focaliza en los fagos y no tanto en sus productos. Además, actualmente parece que sólo tres empresas: Novolytics Limited (Reino Unido), Phico Therapeutics (Reino Unido) y Biophage Pharma Inc. (Canadá) se encuentran próximas a la realización de los primeros ensayos clínicos.

En resumen, el conocimiento adquirido sobre las características físico-químicas de las enzimas Cpl-1, Cpl-7 y sus variantes mejoradas Cpl-7S y Cpl-711, apuntan hacia un método general que podría seguirse para conseguir la máxima actividad de los enzibióticos frente a los patógenos susceptibles. Dado que este tipo de enzimas son modulares, cabe la posibilidad de fusionar adecuadamente sus elementos estructurales y conseguir una nueva quimera que mejore las propiedades antibacterianas de las proteínas parentales, como en el caso de Cpl-711. La gran abundancia de posibles enzibióticos ligada al enorme número de fagos en la naturaleza, junto con la combinación de propiedades ventajosas de estas proteínas, como son la especificidad de sustrato, modularidad y robustez enzimática, hacen previsible que, en un

futuro próximo, se pueda pensar en diseñar enzimas a la carta frente a diferentes patógenos, especialmente los que se muestren muy refractarios contra el arsenal de antibióticos existentes en el mercado. Este escenario futuro pasaría por conseguir el conocimiento detallado de las estructuras cristalinas de las mureín-hidrolasas naturales o sintéticas y las interacciones clave entre módulos, así como entre la enzima y el correspondiente sustrato. De esta forma, no es atrevido pensar que, en pocos años, se podrían combinar los módulos adecuados para crear nuevas y mejores enzimas que sean eficaces únicamente frente al patógeno, o grupo de patógenos, implicados en una infección localizada sin afectar la viabilidad de la microbiota circundante.

El tercer gran objetivo de esta Tesis Doctoral, consistió en caracterizar el posible efecto sinérgico combinando enzibióticos y antibióticos frente a la ENI. Esto sería de gran interés, ya que, en la actualidad, *S. pneumoniae* sigue siendo uno de los patógenos humanos más importantes, según se desprende de las tasas de morbilidad y mortalidad como consecuencia de la ENI, lo que supone un alto impacto social y económico. Desde principios de la década de 1950, el descubrimiento y uso consiguiente de varios antibióticos, como es el caso de la penicilina, representaron hitos importantes en la lucha contra las infecciones microbianas. Sin embargo, en los últimos años y como consecuencia del uso abusivo de los antibióticos, se ha producido un aumento considerable de las cepas resistentes a un alto número de dichos compuestos, provocando así importantes problemas para la salud pública (Putman *et al.*, 2000).

A partir de estas consideraciones, la comunidad científica está tratando de encontrar tratamientos alternativos frente a patógenos de gran interés clínico y que presentan altas tasas de resistencias. En este contexto, una de las posibles y más prometedoras aproximaciones terapéuticas se basa en la llamada terapia fágica. Dentro de esta terapia se considera el empleo tanto de bacteriófagos enteros (viriones) como de alguno de sus productos. Un tipo de estas proteínas fágicas son las denominadas endolisinas, enzimas codificadas por los genomas de fagos que se sintetizan durante la fase tardía del ciclo lítico con la finalidad de degradar la pared celular y permitir la liberación de la progenie. El empleo de estos compuestos presenta una serie de ventajas frente a los antibióticos tradicionales, como son su alta eficacia, especificidad, que evita la interferencia con la microbiota comensal, un costo inferior al empleo de antibióticos y ausencia de efectos secundarios graves. Además, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún tipo de resistencia frente a las endolisinas, ya que su sitio de acción es el peptidoglicano, que es un polímero altamente conservado entre todas las bacterias (Pastagia *et al.*, 2013).

No obstante, el empleo de endolisinas como agentes terapéuticos presenta algunas limitaciones, como su corto tiempo de vida, la dificultad de obtener y conservar preparaciones de gran pureza, la generación de posibles anticuerpos neutralizantes e, incluso, el uso de regulaciones específicas para productos basados en fagos, ya que su farmacodinámica es completamente distinta a la de cualquier otro fármaco (Pastagia *et al.*, 2013)

Por todo ello y ante la dificultad de encontrar nuevos fármacos eficaces frente a las bacterias multirresistentes, se ha propuesto la idea de combinar diferentes antibióticos entre sí o junto con un componente lítico como las endolisinas, con el objetivo final de aumentar la efectividad global de los antibióticos y reducir drásticamente los procesos infecciosos. La combinación de endolisinas con diferentes antibióticos, ha permitido obtener resultados sinérgicos en cuanto al aumento del poder bactericida de los enzibióticos por sí solos, como ya

se ha demostrado con la combinación de Cpl-1 y gentamicina o penicilina (Djurkovic *et al.*, 2005), daptomicina (Vouillamoz *et al.*, 2013) o la proteína quimérica ClyS junto a oxacilina (Daniel *et al.*, 2010). Además, la ventaja de combinar enzimas líticas con antibióticos con el fin de potenciar el efecto antimicrobiano de ambos de forma sinérgica, podría conseguir tasas eficaces de protección, utilizando concentraciones subinhibitorias de los antibióticos frente a patógenos inicialmente resistentes, ayudando de este modo, a evitar la aparición de resistencias antibióticas por el uso de dosis elevadas de antibióticos o bien por el uso continuado de los mismos. En este sentido, el objetivo del trabajo ha sido el estudio de la existencia de sinergia mediante la combinación de antibióticos ampliamente utilizados en clínica como es la CTX junto con la enzima lítica Cpl-711. Esta enzima de origen quimérico, construida a partir de la fusión de los diferentes elementos estructurales de las enzimas fágicas parentales Cpl-1 y Cpl-7 actúa hidrolizando rápidamente los enlaces peptidoglicano de la pared bacteriana, lo que provoca la lisis y la muerte de *S. pneumoniae* (Díez-Martínez *et al.*, 2015). Además, hasta la fecha, se trata de la enzima más potente descrita frente a este patógeno, como queda de manifiesto una vez más en los experimentos de determinación de la MIC realizados en este trabajo. Los resultados obtenidos revelan que Cpl-711 presenta unos valores de CMI más bajos para las cepas de *S. pneumoniae* empleadas, encontrándose en el mismo rango de los valores obtenidos previamente en la cepa ATCC 49619 (Díez-Martínez *et al.*, 2015). En general, estos valores son menores que los descritos para Cpl-1 (Djurkovic *et al.*, 2005), considerada como la enzima más letal frente a neumococo antes de la construcción de Cpl-711.

Como ya se ha comentado anteriormente, un aspecto importante en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a la ENI podría ser el uso combinado de enzibióticos y antibióticos de uso común frente a infecciones relevantes que afectan a humanos. Gracias a esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que la administración de concentraciones sub-protectoras de Cpl-711 y cefotaxima es sinérgica desde el punto de vista terapéutico, permitiendo obtener niveles significativos de protección frente a la sepsis neumocócica causada por un aislado de neumococo con elevada resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Estos resultados suponen un gran avance en la lucha frente a la ENI producida por aislados clínicos multirresistentes.

El objetivo de cualquier tratamiento antibiótico es la disminución rápida de la carga bacteriana. Recientemente, la carga bacteriana se ha asociado con la severidad de la infección en pacientes con neumonía neumocócica (Rello *et al.*, 2009). Estudios previos con modelos animales habían mostrado el efecto que tienen anticuerpos específicos o antibióticos β -lactámicos (AMX y CTX) en el perfil bacteriémico y su relación con mortalidad (Yuste *et al.*, 2002a; Yuste *et al.*, 2002b). En nuestro estudio el perfil bacteriémico también se asoció con letalidad, investigando la predicción de mortalidad mediante la relación de los recuentos bacterianos en sangre en las primeras horas después de la primera dosis administrada. En las primeras 24h, cuando todos los animales estaban aún vivos, el grupo de animales muertos el día 7 mostraba una alta carga bacteriana, mientras que en el grupo de animales que sobrevivían el día 7 los recuentos bacterianos fueron mucho más bajos. Estos hallazgos subrayan la importancia que, para la eficacia terapéutica, tiene, una rápida actividad antibacteriana, responsable de una reducción temprana de la carga bacteriana.

La obtención de sinergia con cefotaxima, que es un antibiótico perteneciente a la familia de los β -lactámicos, podría estar relacionada con su mecanismo de acción. Este antibiótico actúa inhibiendo las enzimas denominadas “proteínas de unión a penicilina”, esenciales para la

síntesis de peptidoglicano. Este polímero está muy conservado entre las bacterias, a las que protege de la presión osmótica y les da forma, por lo que la inhibición de su síntesis imposibilita la elongación y división bacteriana (Hakenbeck *et al.*, 2012). En neumococo, se ha demostrado sinergia entre la enzima Cpl-1 y penicilina, planteando la posibilidad de que la administración de la endolisina pudiera aumentar la accesibilidad del antibiótico a su sitio de unión en la pared celular, aunque todavía se desconoce el mecanismo detallado de dicho efecto sinérgico (Djurkovic *et al.*, 2005).

Los antibióticos β -lactámicos ejercen su actividad bactericida por una acción directa sobre el microorganismo. Sin embargo, la ENI está asociada con altos niveles de mortalidad y morbilidad a pesar de una terapia antibiótica adecuada (Austrian y Gold, 1964). Esta falta de eficacia antibiótica es muy común, siendo especialmente evidente en pacientes inmunodeprimidos, sugiriendo que la recuperación de estos pacientes depende de la acción conjunta de los antibióticos y los mecanismos de defensa del hospedador. La alteración de las estructuras superficiales bacterianas causadas por determinados antibióticos y/o enzibióticos, podría dar lugar a una mayor exposición de epítopos antigénicos profundos que normalmente están poco accesibles o, incluso, escondidos. Esta mayor exposición podría promover la opsonización por parte de diferentes componentes de defensa del hospedador, como las proteínas de fase aguda, mejorando así el reconocimiento de los patógenos por parte de los fagocitos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012a; Ramos-Sevillano *et al.*, 2012b). En este sentido, el uso de cefalosporinas se ha asociado con un incremento en la actividad bactericida del suero frente a patógenos como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Darveau y Cunningham, 1990; Jung *et al.*, 1998), mientras que el tratamiento con ERY parece producir pequeños puntos de ruptura en la pared celular, causando una rotura de la envuelta en *Legionella pneumophila* (Elliott y Rodgers, 1985; Rodgers *et al.*, 1990). Además, se ha demostrado que el macrólido azitromicina, en concentraciones inferiores a la CMI, desestabiliza la membrana externa incrementando la permeabilidad y produciendo la muerte de *P. aeruginosa* (Imamura *et al.*, 2005). De un modo alternativo, los antibióticos podrían reducir la expresión de los factores de virulencia involucrados en la inhibición de la activación del complemento. De hecho, un reciente estudio ha confirmado que ciertos antibióticos, en concentraciones subinhibitorias, modifican la expresión de genes de virulencia de *S. aureus* (Subrt *et al.*, 2011). Todas estas alteraciones en la estructura bacteriana inducidas por la exposición bacteriana a determinados antibióticos, podría verse incrementada de forma sinérgica en presencia de concentraciones subinhibitorias de los enzibióticos. De hecho, el daño producido en la superficie del patógeno por los fármacos antimicrobianos tanto Cpl-711 como CTX, podría permitir que ciertos componentes de la envuelta celular bacteriana se encuentren más accesibles para ser reconocidos por el sistema inmune de modo que las células fagocitarias del hospedador pudieran reconocer y eliminar al microorganismo de la circulación sistémica de un modo mucho más eficaz como podría haber ocurrido en el modelo animal de sepsis desarrollado en esta Tesis Doctoral para el estudio del sinergismo entre Cpl-711 y CTX.

Los experimentos realizados con estos enzibióticos sólo han conseguido, hasta ahora, resultados óptimos en bacterias Gram-positivas debido probablemente, a que las Gram-negativas poseen una membrana externa, que dificulta el acceso de estas enzimas a su diana (Kropinski, 2006; Skurnik y Strauch, 2006). No obstante, se ha descrito recientemente un ejemplo en el que se ha combinado la lisina con un transportador de membrana externa para solventar el inconveniente del acceso al peptidoglicano (Lukacik *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta todas estas características, es previsible que el estudio de los enzibióticos cobre mayor

interés cada día, ya que estos compuestos ofrecen grandes posibilidades en la lucha contra las infecciones bacterianas, especialmente las provocadas por cepas multirresistentes.

Por todo lo expuesto anteriormente, el estudio de la sinergia entre antibióticos y endolisinas fágicas desempeña un papel muy importante en la búsqueda de futuras estrategias terapéuticas frente a *S. pneumoniae*, debido a que la administración de concentraciones subinibitorias de ambos compuestos podría evitar la aparición de nuevas resistencias, reduciría las limitaciones que presentan cuando son administrados de forma independiente y supondría un gran avance en la lucha contra la creciente aparición de resistencias a antibióticos.

VI. CONCLUSIONES

1. La proteína LytB de neumococo, es inmunogénica y puede utilizarse como antígeno vacunal al estimular la producción de diferentes tipos de inmunoglobulinas como IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA.
2. Los anticuerpos frente a la proteína LytB estimulan el reconocimiento de diferentes aislados clínicos de neumococo por el componente C1q del complemento activando de este modo la vía clásica del complemento. Además, los anticuerpos generados incrementaron la opsonización por el componente clave C3b favoreciendo el proceso de opsonofagocitosis.
3. La estructura de neumococo sufrió cambios morfológicos en presencia de anticuerpos frente a LytB basados en un incremento de la longitud bacteriana mediante la formación de cadenas. Este fenotipo inducido por los anticuerpos, es compatible con un mayor reconocimiento con la inmunidad mediada por el sistema del complemento.
4. La vacunación con LytB incrementó la supervivencia frente a la neumonía neumocócica producida por diferentes serotipos de neumococo. Esta mayor protección inducida por los anticuerpos frente a LytB, estuvo asociada a una mayor capacidad para controlar la replicación bacteriana desde el pulmón a la circulación sistémica.
5. La inmunización con la proteína LytB protegió frente a la sepsis neumocócica al disminuir los niveles de bacteria en sangre, confirmando que los anticuerpos frente a LytB son capaces de frenar la diseminación bacteriana en el torrente circulatorio.
6. La administración de la enzima lítica Cpl-7S no mostró efecto bactericida cuando se añadió de forma exógena sobre cultivos celulares colonizados por diferentes aislados clínicos de *S. pneumoniae*.
7. La exposición de concentraciones crecientes de Cpl-1 y Cpl-711 a cultivos de células epiteliales humanas de nasofaringe y pulmón, redujo la colonización neumocócica frente a diferentes serotipos de neumococo. Este efecto fue más marcado en el caso del compuesto Cpl-711.
8. El tratamiento con las endolisinas Cpl-1 y Cpl-711 fue capaz de reducir la colonización de la nasofaringe de forma significativa en un modelo murino de infección. Tan sólo el compuesto Cpl-711 logró erradicar el estado de portador en algunos animales.
9. La combinación de Cpl-711 y cefotaxima en concentraciones subinhibitorias, incrementó la supervivencia y disminuyó los niveles de bacteria en sangre cuando se administraron de forma conjunta frente a la sepsis neumocócica en comparación al tratamiento con cada compuesto de forma individual.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abedon, S.T. (2015). Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage* 5, e1020260.

Adamou, J.E., Heinrichs, J.H., Erwin, A.L., Walsh, W., Gayle, T., Dormitzer, M., Dagan, R., Brewah, Y.A., Barren, P., Lathigra, R., *et al.* (2001). Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins (the Pht family) that are protective against sepsis. *Infect Immun* 69, 949–958.

Agarwal, V., Asmat, T.M., Dierdorf, N.I., Hauck, C.R., and Hammerschmidt, S. (2010). Polymeric immunoglobulin receptor-mediated invasion of *Streptococcus pneumoniae* into host cells requires a coordinate signaling of SRC family of protein-tyrosine kinases, ERK, and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 285, 35615–35623.

Agarwal, V., Kuchipudi, A., Fulde, M., Riesbeck, K., Bergmann, S., and Blom, A.M. (2013). *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J Biol Chem* 288, 6849–6863.

Aguinagalde, L., Corsini, B., Domenech, A., Domenech, M., Cámara, J., Ardanuy, C., García, E., Liñares, J., Fenoll, A., and Yuste, J. (2015). Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain^{9V}-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PLoS one* 10, e0137565.

Alexander, J.E., Lock, R.A., Peeters, C.C., Poolman, J.T., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., Hansman, D., and Paton, J.C. (1994). Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 62, 5683-5688.

Ali, Y.M., Lynch, N.J., Haleem, K.S., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., Holmskov, U., Takahashi, K., Stahl, G.L., Dudler, T., *et al.* (2012). The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog* 8, e1002793.

Almirall, J., Bolibar, I., Serra-Prat, M., Roig, J., Hospital, I., Carandell, E., Agusti, M., Ayuso, P., Estela, A., Torres, A., *et al.* (2008). New evidence of risk factors for community-acquired pneumonia: a population-based study. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 31, 1274-1284.

AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A.F.M., Verhoef, J., and Snippe, H. (1995). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 59, 591–603.

American Academy of Pediatrics – Committee on Infectious Diseases (2000). Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 106, 362–366.

Amir, J., Scott, M.G., Nahm, M.H., and Granoff, D.M. (1990). Bactericidal and opsonic activity of IgG1 and IgG2 anticapsular antibodies to *Haemophilus influenzae* type b. *The Journal of infectious diseases* 162, 163-171.

Anderton, J.M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A.P., Carlone, G.M., Sampson, J.S., and Ades, E.W. (2007). E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 42, 225–236.

Arrecubieta, C., López, R., and 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, 449–455.

Asmat, T.M., Agarwal, V., R  th, S., Hildebrandt, J.-P., and Hammerschmidt, S. (2011). *Streptococcus pneumoniae* infection of host epithelial cells via polymeric immunoglobulin receptor transiently induces calcium release from intracellular stores. *J Biol Chem* 286, 17861–17869.

Attali, C., Durmort, C., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2008a). The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun* 76, 5350–5356.

Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2008b). *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun* 76, 466–476.

Audouy, S.A., van Selm, S., van Roosmalen, M.L., Post, E., Kanninga, R., Neef, J., Estevao, S., Nieuwenhuis, E.E., Adrian, P.V., Leenhouts, K., *et al.* (2007). Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine* 25, 2497-2506.

- Austrian, R. (1981). Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev Infect Dis* 3 *Suppl*, S1–17.
- Austrian, R. (1986). Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* 18 (*Suppl. A*), 35–45.
- Austrian, R., Douglas, R.M., Schiffman, G., Coetzee, A.M., Koornhof, H.J., Hayden-Smith, S., and Reid, R.D.W. (1976). Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. *Trans Assoc Am Physicians* 89, 184–192.
- Austrian, R., and Gold, J. (1964). Pneumococcal bacteremia with special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med* 60, 759–776.
- Avery, O.T., and Goebel, W.F. (1933). Chemoinmunological studies of the soluble specific substance of pneumococcus. I. The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type 1. *J Exp Med* 58, 731–755.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 79, 137–158.
- Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., Qi, L., Zhang, J.-R., Chen, Y., *et al.* (2014). Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem* 289, 23403–23416.
- Balachandran, P., Brooks-Walter, A., Virolainen-Julkunen, A., Hollingshead, S.K., and 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, 2526–2534.
- Balsalobre, L., Ferrándiz, M.J., Liñares, J., Tubau, F., and de la Campa, A.G. (2003). Viridans group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2072–2081.
- Balsalobre, L., Hernández-Madrid, A., Llull, D., Martín-Galiano, A.J., García, E., Fenoll, A., and de la Campa, A.G. (2006). Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol* 44, 4163–4171.
- Banerjee, A., van Sorge, N.M., Sheen, T.R., Uchiyama, S., Mitchell, T.J., and Doran, K.S. (2010). Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell Microbiol* 12, 1576–1588.
- Barnard, J.P., and Stinson, M.W. (1996). The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun* 64, 3853–3857.
- Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., Dahlberg, S., Fernebro, J., Moschioni, M., Massignani, V., *et al.* (2006). A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2857–2862.
- Basset, A., Trzcinski, K., Hermos, C., O'Brien, K.L., Reid, R., Santosham, M., McAdam, A.J., Lipsitch, M., and Malley, R. (2007). Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased virulence. *Journal of clinical microbiology* 45, 1684–1689.
- Benson, C.E., and Sweeney, C.R. (1984). Isolation of *Streptococcus pneumoniae* type 3 from equine species. *J Clin Microbiol* 20, 1028–1030.
- Bentley, S.D., Aanensen, D., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M., Donohoe, K., Harris, D., Murphy, L., Quail, M.A., *et al.* (2006). Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2, e31.
- Benton, K.A., Paton, J.C., and Briles, D.E. (1997). Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect Immun* 65, 1237–1244.
- Bergmann, S., and Hammerschmidt, S. (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152, 295–303.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57, 2324–2330.
- Berry, A.M., Lock, R.A., and Paton, J.C. (1996). Cloning and characterization of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 4854–4860.

Berry, A.M., and Paton, J.C. (1996). Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* *64*, 5255-5262.

Berry, A.M., and Paton, J.C. (2000). Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* *68*, 133–140.

Biziulevicius, G.A., Biziuleviciene, G., and Kazlauskaitė, J. (2008). A list of enzyme preparations covered by the term enzybiotics should not be restricted to bacteriophage-encoded peptidoglycan hydrolases (lysins). *The Journal of pharmacy and pharmacology* *60*, 531-532.

Bogaert, D., de Groot, R., and Hermans, P.W.M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* *4*, 144–154.

Bogaert, D., Sluijter, M., Lemmens-den Toom, N., Mitchell, T.J., Goessens, W.H.F., Clarke, S.C., de Groot, R., and Hermans, P.W.M. (2006). Dynamics of pneumococcal colonization in healthy Dutch children. *Microbiology* *152*, 377-385.

Bologa, M., Kamtchoua, T., Hopfer, R., Sheng, X., Hicks, B., Bixler, G., Hou, V., Pehlic, V., Yuan, T., and Gurunathan, S. (2012). Safety and immunogenicity of pneumococcal protein vaccine candidates: monovalent choline-binding protein A (PcpA) vaccine and bivalent PcpA-pneumococcal histidine triad protein D vaccine. *Vaccine* *30*, 7461-7468.

Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., and Gorski, A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med* *231*, 366–377.

Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2011). Phagocytosis. *Curr Biol* *21*, R533–R538.

Braun, J.S., Sublett, J.E., Freyer, D., Mitchell, T.J., Cleveland, J.L., Tuomanen, E.I., and Weber, J.R. (2002). Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* *109*, 19–27.

Bredius, R.G., Driedijk, P.C., Schouten, M.F., Weening, R.S., and Out, T.A. (1992). Complement activation by polyclonal immunoglobulin G1 and G2 antibodies against *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* type b, and tetanus toxoid. *Infection and immunity* *60*, 4838-4847.

Briles, D.E., Ades, E., Paton, J.C., Sampson, J.S., Carlone, G.M., Huebner, R.C., Virolainen, A., Swiatlo, E., and Hollingshead, S.K. (2000a). Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* *68*, 796-800.

Briles, D.E., Clafflin, J.L., Schroer, K., and Forman, C. (1981). Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* *294*, 88–90.

Briles, D.E., Crain, M.J., Gray, B.M., Forman, C., and Yother, J. (1992). Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *60*, 111–116.

Briles, D.E., Hollingshead, S.K., King, J., Swift, A., Braun, P.A., Park, M.K., Ferguson, L.M., Nahm, M.H., and Nabors, G.S. (2000b). Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *The Journal of infectious diseases* *182*, 1694-1701.

Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Paton, J.C., Ades, E.W., Novak, L., van Ginkel, F.W., and Benjamin, W.H., Jr. (2003). Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases* *188*, 339-348.

Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks-Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., McDaniel, L.S., Benton, K.A., White, P., Prellner, K., *et al.* (1997). PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* *3*, 401–408.

Briles, D.E., King, J.D., Gray, M.A., McDaniel, L.S., Swiatlo, E., and Benton, K.A. (1996). PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine* *14*, 858-867.

Briles, D.E., Novak, L., Hotomi, M., van Ginkel, F.W., and King, J. (2005). Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. *Infect Immun* *73*, 6945–6951.

Brock, S.C., McGraw, P.A., Wright, P.F., and Crowe, J.E., Jr. (2002). The human polymeric immunoglobulin receptor facilitates invasion of epithelial cells by *Streptococcus pneumoniae* in a strain-specific and cell type-specific manner. *Infect Immun* *70*, 5091–5095.

Brooks-Walter, A., Briles, D.E., and 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, 6533–6542.

Brouwer, M.C., de Gans, J., Heckenberg, S.G.B., Zwinderman, A.H., van der Poll, T., and van de Beek, D. (2009). Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9, 31–44.

Brown, E.J., Hosea, S.W., and Frank, M.M. (1983). The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. *Reviews of infectious diseases* 5 Suppl 4, S797-805.

Brown, J.S., Gilliland, S.M., and Holden, D.W. (2001a). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol* 40, 572–585.

Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., and Botto, M. (2002a). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16969–16974.

Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., and Botto, M. (2002b). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16969-16974.

Brown, J.S., Ogunniyi, A.D., Woodrow, M.C., Holden, D.W., and Paton, J.C. (2001b). Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and immunity* 69, 6702-6706.

Brueggemann, A.B., Griffiths, D.T., Meats, E., Peto, T., Crook, D.W., and Spratt, B.G. (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 187, 1424–1432.

Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., and Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog* 3, e168.

Brundish, D.E., and Baddiley, J. (1968). Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J* 110, 573–582.

Brussow, H. (2005). Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology* 151, 2133-2140.

Brüssow, H., and Hendrix, R.W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108, 13–16.

Burnaugh, A.M., Frantz, L.J., and King, S.J. (2008). Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J Bacteriol* 190, 221–230.

Bustamante, N. (2009). Caracterización de la endolisina Cpl-7: un caso particular entre las enzimas que degradan la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*. In Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid.).

Bustamante, N., Campillo, N.E., García, E., Gallego, C., Pera, B., Diakun, G.P., Sáiz, J.L., García, P., Díaz, J.F., and Menéndez, M. (2010). Cpl-7, a lysozyme encoded by a pneumococcal bacteriophage with a novel cell wall-binding motif. *J Biol Chem* 285, 33184–33196.

Butler, J.C. (2004). Epidemiology of pneumococcal disease. In *The pneumococcus*, E.I. Tuomanen, T.J. Mitchell, D.A. Morrison, and B.G. Spratt, eds. (Washington, D.C.: ASM Press), pp. 148–168.

Butterfield, E.E., and Peabody, F.W. (1913). The action of pneumococcus on blood. *J Exp Med* 17, 587–592.

Calix, J.J., Porambo, R.J., Brady, A.M., Larson, T.R., Yother, J., Abeygunwardana, C., and 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, 27885–27894.

Camara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994). A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infection and immunity* 62, 3688-3695.

Cámara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994). A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* 62, 3688–3695.

Carlsen, B.D., Kawana, M., Kawana, C., Tomasz, A., and Giebink, G.S. (1992). Role of the bacterial cell wall in middle ear inflammation caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 60, 2850-2854.

- Casadevall, A. (1996). Crisis in infectious diseases: time for a new paradigm? *Clin Infect Dis* 23, 790–794.
- Casadevall, A., and Scharff, M.D. (1994). Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38, 1695-1702.
- Casadevall, A., and Scharff, M.D. (1995). Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 21, 150-161.
- Casal, J. (1982). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 22, 222-225.
- Cecil, R.L., and Austin, J.H. (1918). Results of prophylactic inoculation against pneumococcus in 12,519 men. *J Exp Med* 28, 19–41.
- Celik, I., Stover, C., Botto, M., Thiel, S., Tzima, S., Künkel, D., Walport, M., Lorenz, W., and Schwaeble, W. (2001). Role of the classical pathway of complement activation in experimentally induced polymicrobial peritonitis. *Infect Immun* 69, 7304–7309.
- Clarke, V.A., Platt, N., and Butters, T.D. (1995). Cloning and expression of the β -*N*-acetylglucosaminidase gene from *Streptococcus pneumoniae*. Generation of truncated enzymes with modified aglycon specificity. *J Biol Chem* 270, 8805–8814.
- Claverys, J.-P. (2001). A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res Microbiol* 152, 231–243.
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., and Martin, B. (2000). Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol Microbiol* 35, 251–259.
- Coffman, R.L., Sher, A., and Seder, R.A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492-503.
- Cole, R. (1914). The production of methemoglobin by pneumococci. *J Exp Med* 20, 363–378.
- Coonrod, J.D., Varble, R., and Yoneda, K. (1991). Mechanism of killing of pneumococci by lysozyme. *J Infect Dis* 164, 527–532.
- Csordas, F.C., Perciani, C.T., Darrieux, M., Goncalves, V.M., Cabrera-Crespo, J., Takagi, M., Sbrogio-Almeida, M.E., Leite, L.C., and Tanizaki, M.M. (2008). Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Vaccine* 26, 2925-2929.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idänpään-Heikkilä, I., and Tuomanen, E.I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377, 435–438.
- Chanter, N. (1994). *Streptococcus pneumoniae* and equine disease. *Equine Vet J* 26, 5–6.
- Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., and Fischetti, V.A. (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 111-117.
- Chester, F.D. (1901). *A manual of determinative bacteriology* (New York: The MacMillan Co.).
- Chi, F., Leider, M., Leendertz, F., Bergmann, C., Boesch, C., Schenk, S., Pauli, G., Ellerbrok, H., and Hakenbeck, R. (2007). New *Streptococcus pneumoniae* clones in deceased wild chimpanzees. *J Bacteriol* 189, 6085–6088.
- Chiavolini, D., Pozzi, G., and Ricci, S. (2008). Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev* 21, 666–685.
- Choe, Y.J., Lee, H.J., Lee, H., Oh, C.E., Cho, E.Y., Choi, J.H., Kang, H.M., Yoon, I.A., Jung, H.J., and Choi, E.H. (2016). Emergence of antibiotic-resistant non-vaccine serotype pneumococci in nasopharyngeal carriage in children after the use of extended-valency pneumococcal conjugate vaccines in Korea. *Vaccine* 34, 4771-4776.
- Choi, E.H., Zhang, F., Lu, Y.J., and Malley, R. (2016). Capsular Polysaccharide (CPS) Release by Serotype 3 Pneumococcal Strains Reduces the Protective Effect of Anti-Type 3 CPS Antibodies. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 23, 162-167.
- Dahlgren, C., and Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232, 3–14.

Dalia, A.B., Standish, A.J., and Weiser, J.N. (2010). Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. *Infect Immun* *78*, 2108–2116.

Dalia, A.B., and Weiser, J.N. (2011). Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody. *Cell host & microbe* *10*, 486–496.

Daniel, A., Euler, C., Collin, M., Chahales, P., Gorelick, K.J., and Fischetti, V.A. (2010). Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* *54*, 1603–1612.

Daniels, C.C., Coan, P., King, J., Hale, J., Benton, K.A., Briles, D.E., and Hollingshead, S.K. (2010). The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. *Infection and immunity* *78*, 2163–2172.

Darrieux, M., Moreno, A.T., Ferreira, D.M., Pimenta, F.C., de Andrade, A.L., Lopes, A.P., Leite, L.C., and Miyaji, E.N. (2008). Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *Journal of medical microbiology* *57*, 273–278.

Darveau, R.P., and Cunningham, M.D. (1990). Influence of subinhibitory concentrations of cephalosporins on the serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* *162*, 914–921.

Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K., and McDaniel, L.S. (2001). PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* *69*, 3435–3437.

Davis, K.M., and Weiser, J.N. (2011). Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect Immun* *79*, 562–570.

De, B.K., Sampson, J.S., Ades, E.W., Huebner, R.C., Jue, D.L., Johnson, S.E., Espina, M., Stinson, A.R., Briles, D.E., and Carlone, G.M. (2000). Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesin A expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine* *18*, 1811–1821.

de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., and Muñoz, R. (1997). Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb Drug Resist* *3*, 177–193.

de las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2001). Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist* *7*, 213–222.

De las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -*N*-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* *184*, 4988–5000.

Deban, L., Jarva, H., Lehtinen, M.J., Bottazzi, B., Bastone, A., Doni, A., Jokiranta, T.S., Mantovani, A., and Meri, S. (2008). Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J Immunol* *181*, 8433–8440.

Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* *121*, 2115–2122.

Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R., and Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist* *18*, 344–358.

Denapaite, D., and Hakenbeck, R. (2011). A new variant of the capsule 3 cluster occurs in *Streptococcus pneumoniae* from deceased wild chimpanzees. *PloS one* *6*, e25119.

Denoel, P., Philipp, M.T., Doyle, L., Martin, D., Carletti, G., and Poolman, J.T. (2011). A protein-based pneumococcal vaccine protects rhesus macaques from pneumonia after experimental infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* *29*, 5495–5501.

Díez-Martínez, R., de Paz, H.D., Bustamante, N., García, E., Menéndez, M., and García, P. (2013). Improving the lethal effect of Cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. *Antimicrob Agents Chemother* *57*, 5355–5365.

Díez-Martínez, R., De Paz, H.D., García-Fernández, E., Bustamante, N., Euler, C.W., Fischetti, V.A., Menendez, M., and García, P. (2015). A novel chimeric phage lysin with high *in vitro* and *in vivo* bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* *70*, 1763–1773.

Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.-P. (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* *25*, 727–739.

Djurkovic, S., Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2005). Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* *49*, 1225–1228.

Doehn, J.M., Fischer, K., Reppe, K., Gutbier, B., Tschernig, T., Hocke, A.C., Fischetti, V.A., Löffler, J., Suttorp, N., Hippenstiel, S., *et al.* (2013). Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* *68*, 2111–2117.

Domenech, M., García, E., and Moscoso, M. (2011). In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother* *55*, 4144–4148.

Domenech, M., García, E., Prieto, A., and Moscoso, M. (2013). Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ Microbiol* *15*, 502–516.

Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N., Angiuoli, S., Oggioni, M., Dunning Hotopp, J., Hu, F., Riley, D., *et al.* (2010). Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome Biol* *11*, R107.

Donovan, D.M., and Foster-Frey, J. (2008). LambdaSa2 prophage endolysin requires Cpl-7-binding domains and amidase-5 domain for antimicrobial lysis of streptococci. *FEMS Microbiol Lett* *287*, 22–33.

Dunstone, M.A., and Tweten, R.K. (2012). Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Curr Opin Struct Biol* *22*, 342–349.

Duvvuri, V.R., Deng, X., Teatero, S., Memari, N., Athey, T., Fittipaldi, N., and Gubbay, J.B. (2016). Population structure and drug resistance patterns of emerging non-PCV-13 *Streptococcus pneumoniae* serotypes 22F, 15A, and 8 isolated from adults in Ontario, Canada. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* *42*, 1–8.

Eberhardt, A., Hoyland, C.N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R.M., Johnsborg, O., Håvarstein, L.S., Lewis, R.J., and Vollmer, W. (2012). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* *18*, 240–255.

Eisen, D.P. (2010). Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection. *J Innate Immun* *2*, 114–122.

Elliott, T.S.J., and Rodgers, F.G. (1985). Morphological response and growth characteristics of *Legionella pneumophila* exposed to ampicillin and erythromycin. *J Med Microbiol* *19*, 383–390.

Endo, Y., Matsushita, M., and Fujita, T. (2011). The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol* *43*, 705–712.

Endo, Y., Takahashi, M., Iwaki, D., Ishida, Y., Nakazawa, N., Kodama, T., Matsuzaka, T., Kanno, K., Liu, Y., Tsuchiya, K., *et al.* (2012). Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J Immunol* *189*, 5860–5866.

Eriksen, K.R. (1945). Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type I. *Acta Pathol Microbiol Scand* *23*, 398–401.

Esposito, S., Terranova, L., Patria, M.F., Marseglia, G.L., Miraglia del Giudice, M., Bodini, A., Martelli, A., Baraldi, E., Mazzina, O., Tagliabue, C., *et al.* (2016). *Streptococcus pneumoniae* colonisation in children and adolescents with asthma: impact of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine and evaluation of potential effect of thirteen-valent pneumococcal conjugate vaccine. *BMC infectious diseases* *16*, 12.

Evans, B.A., and Rozen, D.E. (2012). A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* *31*, 2653–2660.

Exley, R.M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y.-h., West, N.P., Williamson, M., Botto, M., Smith, H., and Tang, C.M. (2005). Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J Exp Med* *201*, 1637–1645.

Fairn, G.D., and Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* *33*, 397–405.

Farrand, A.J., LaChapelle, S., Hotze, E.M., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. (2010). Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 4341-4346.

Felch, J.W., Inagami, T., and Hash, J.H. (1975). The N, O-diacetylmuramidase of *Chalaropsis* species. V. The complete amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry* *250*, 3713-3720.

Feldman, C., and Anderson, R. (2014). Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. *J Infect* *69*, 309–325.

Feldman, C., Anderson, R., Cockeran, R., Mitchell, T., Cole, P., and Wilson, R. (2002). The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium *in vitro*. *Respir Med* *96*, 580–585.

Feldman, C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., Read, R.C., Todd, H.C., Cole, P.J., and Wilson, R. (1990). The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium *in vivo*. *Microb Pathog* *9*, 275–284.

Fenoll, A. (1994). Estirpes atípicas de *Streptococcus pneumoniae*. Bases moleculares de la resistencia a optoquina. In Facultad de Ciencias Biológicas (Madrid: Universidad Complutense).

Fenoll, A., Giménez, M.-J., Vicioso, M.-D., Granizo, J.-J., Robledo, O., and Aguilar, L. (2009a). Susceptibility of pneumococci causing meningitis in Spain and prevalence among such isolates of serotypes contained in the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *J Antimicrob Chemother* *64*, 1338–1340.

Fenoll, A., Granizo, J.J., Aguilar, L., Giménez, M.J., Aragonese-Fenoll, L., Hanquet, G., Casal, J., and Tarragó, D. (2009b). Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol* *47*, 1012–1020.

Fenoll, A., Granizo, J.J., Gimenez, M.J., Yuste, J., and 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*, 5691-5699.

Fenoll, A., Martín Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D., and 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.

Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2002). Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J Mol Biol* *321*, 163–173.

Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2001). A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* *8*, 1020–1024.

Ferreira, D.M., Darrieux, M., Silva, D.A., Leite, L.C., Ferreira, J.M., Jr., Ho, P.L., Miyaji, E.N., and Oliveira, M.L. (2009). Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI* *16*, 636-645.

Ferreira, D.M., Jambo, K.C., and Gordon, S.B. (2011). Experimental human pneumococcal carriage models for vaccine research. *Trends Microbiol* *19*, 464–470.

Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., *et al.* (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* *38*, D211–D222.

Fischer, W. (2000). Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol* *151*, 421–427.

Fischer, W., Behr, T., Hartmann, R., Peter-Katalinić, J., and 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*, 851–857.

Fischetti, V. (2006). Using phage Lytic Enzymes to Control Pathogenic Bacteria. *BMC oral health* *6*, S16.

Fischetti, V.A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* *11*, 393–400.

Fischetti, V.A. (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol* *300*, 357–362.

Fischetti, V.A., Nelson, D., and Schuch, R. (2006). Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nature biotechnology* 24, 1508-1511.

Fletcher, M.A., and Fritzell, B. (2007). Brief review of the clinical effectiveness of PREVENAR® against otitis media. *Vaccine* 25, 2507-2512.

Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H., and Loessner, M.J. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology* 66, 2951-2958.

García-Laorden, M.I., de Castro, F.R., Solé-Violán, J., Payeras, A., Briones, M.L.-, Borderías, L., Aspa, J., Blanquer, J., Rajas, O., Marcos-Ramos, J.A., *et al.* (2013). The role of mannose-binding lectin on pneumococcal infection. *Eur Resp J* 41, 131-139.

García, C.C., Russo, R.C., Guabiraba, R., Fagundes, C.T., Polidoro, R.B., Tavares, L.P., Salgado, A.P.C., Cassali, G.D., Sousa, L.P., Machado, A.V., *et al.* (2010). Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by influenza A in mice. *PLoS Pathog* 6, e1001171.

García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P., and López, R. (1985). Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 201, 225-230.

García, E., and López, R. (1997). Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 149, 1-10.

García, E., and López, R. (2002). Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap* 15, 306-312.

García, P., García, J.L., García, E., and López, R. (1986). Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* 43, 265-272.

García, P., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M., and López, R. (1990). Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* 86, 81-88.

García, P., González, M.P., García, E., García, J.L., and López, R. (1999a). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol* 33, 128-138.

García, P., González, M.P., García, E., López, R., and García, J.L. (1999b). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* 31, 1275-1277.

Garnacho-Montero, J., García-Cabrera, E., Jiménez-Álvarez, R., Díaz-Martín, A., Revuelto-Rey, J., Aznar-Martín, J., and Garnacho-Montero, C. (2012). Genetic variants of the MBL2 gene are associated with mortality in pneumococcal sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73, 39-44.

Geelen, S., Bhattacharyya, C., and Tuomanen, E. (1993). The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 61, 1538-1543.

Gilmer, D.B., Schmitz, J.E., Euler, C.W., and Fischetti, V.A. (2013). Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 2743-2750.

Gillespie, S.H., McHugh, T.D., Ayres, H., Dickens, A., Efstratiou, A., and Whiting, G.C. (1997). Allelic variation in *Streptococcus pneumoniae* autolysin (*N*-acetyl muramoyl-L-alanine amidase). *Infect Immun* 65, 3936-3938.

Ginsburg, A.S., Nahm, M.H., Khambaty, F.M., and Alderson, M.R. (2012). Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines. *Expert review of vaccines* 11, 279-285.

Gladstone, R.A., Gritzfeld, J.F., Coupland, P., Gordon, S.B., and Bentley, S.D. (2015). Genetic stability of pneumococcal isolates during 35 days of human experimental carriage. *Vaccine* 33, 3342-3345.

Godfroid, F., Hermand, P., Verlant, V., Denoël, P., and Poolman, J.T. (2011). Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. *Infection and immunity* 79, 238-245.

Golda, A., Malek, N., Dudek, B., Zeglen, S., Wojarski, J., Ochman, M., Kucewicz, E., Zembala, M., Potempa, J., and Pyrc, K. (2011). Infection with human coronavirus NL63 enhances streptococcal adherence to epithelial cells. *J Gen Virol* 92, 1358-1368.

Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C.A., Ho, T., Giannoulatos, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., *et al.* (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet* 44, 352-355.

- Gor, D.O., Ding, X., Li, Q., Schreiber, J.R., Dubinsky, M., and Greenspan, N.S. (2002). Enhanced immunogenicity of pneumococcal surface adhesin A by genetic fusion to cytokines and evaluation of protective immunity in mice. *Infection and immunity* 70, 5589-5595.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68, 5690–5695.
- Gram, C. (1884). Ueber die isolirte färbung der schizomycetes in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschr Med* 2, 185–189.
- Grandgirard, D., Loeffler, J.M., Fischetti, V.A., and Leib, S.L. (2008). Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 197, 1519–1522.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27, 113–159.
- Gritzfeld, J.F., Wright, A.D., Collins, A.M., Pennington, S.H., Wright, A.K., Kadioglu, A., Ferreira, D.M., and Gordon, S.B. (2013). Experimental human pneumococcal carriage. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Guillemot, D., Carbon, C., Balkau, B., Geslin, P., Lecoœur, H., Vauzelle-Kervroedan, F., Bouvenot, G., and Eschwege, E. (1998). Low dosage and long treatment duration of beta-lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 279, 365-370.
- Haas, W., Hesje, C.K., Sanfilippo, C.M., and Morris, T.W. (2011). High proportion of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* isolates among sporadic, nonoutbreak cases of bacterial conjunctivitis. *Curr Eye Res* 36, 1078–1085.
- Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D., and Maurer, P. (2012). Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol* 7, 395–410.
- Hamel, J., Charland, N., Pineau, I., Ouellet, C., Rioux, S., Martin, D., and Brodeur, B.R. (2004). Prevention of pneumococcal disease in mice immunized with conserved surface-accessible proteins. *Infect Immun* 72, 2659–2670.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., and Chhatwal, G.S. (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67, 1683–1687.
- Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G.S. (1997). SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25, 1113–1124.
- Hammerschmidt, S., Tillig, M.P., Wolff, S., Vaerman, J.P., and Chhatwal, G.S. (2000). Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* 36, 726–736.
- Hancock, R.E.W. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* 5, 209–218.
- Hanlon, G.W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents* 30, 118-128.
- Hansman, D., and Bullen, M.M. (1967). A resistant pneumococcus. *Lancet* 290, 264–265.
- Harvey, R.M., Ogunniyi, A.D., Chen, A.Y., and Paton, J.C. (2011). Pneumolysin with low hemolytic activity confers an early growth advantage to *Streptococcus pneumoniae* in the blood. *Infect Immun* 79, 4122–4130.
- Håvarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1999). Quorum-sensing and peptide pheromones in streptococcal competence for genetic transformation. In *Cell-cell signalling in bacteria*, G.M. Dunny, and S.C. Winans, eds. (Washington, D.C.: ASM Press), pp. 9–26.
- Heidelberger, M. (1983). Precipitating cross-reactions among pneumococcal types. *Infect Immun* 41, 1234–1244.
- Heidelberger, M., and Avery, O.T. (1923). The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med* 38, 73–79.
- Heidelberger, M., and Avery, O.T. (1924). The soluble specific substance of pneumococcus. Second paper. *J Exp Med* 40, 301–317.
- Heidelberger, M., Goebel, W.F., and Avery, O.T. (1925). The soluble specific substance of pneumococcus. Third paper. *J Exp Med* 42, 727–745.

Hendriksen, W.T., Bootsma, H.J., Estevão, S., Hoogenboezem, T., de Jong, A., de Groot, R., Kuipers, O.P., and Hermans, P.W.M. (2008). CodY of *Streptococcus pneumoniae*: link between nutritional gene regulation and colonization. *J Bacteriol* *190*, 590–601.

Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* *33*, 2759–2762.

Henriques-Normark, B., and Normark, S. (2010). Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp Cell Res* *316*, 1408–1414.

Hermoso, J.A., García, J.L., and García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* *10*, 461–472.

Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., and Menéndez, M. (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 533–538.

Hernani Mde, L., Ferreira, P.C., Ferreira, D.M., Miyaji, E.N., Ho, P.L., and Oliveira, M.L. (2011). Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein C primes the immune system and decreases pneumococcal nasopharyngeal colonization in mice. *FEMS immunology and medical microbiology* *62*, 263-272.

Hirst, C., and Owusu-Ofori, S. (2014). Prophylactic antibiotics for preventing pneumococcal infection in children with sickle cell disease. *Cochrane database of systematic reviews*, CD003427.

Hirst, R., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C., Nicotera, P., Andrew, P., and O'Callaghan, C. (2008). *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J Infect Dis* *197*, 744–751.

Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L., and Jenkinson, H.F. (2001). The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* *41*, 1395–1408.

Höltje, J.-V., and Tomasz, A. (1975). Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by *N*-acetylmuramic acid Γ -alanine amidase of pneumococcus. *J Biol Chem* *250*, 6072–6076.

Höltje, J.V., and Tomasz, A. (1976). Purification of the pneumococcal *N*-acetylmuramyl- Γ -alanine amidase to biochemical homogeneity. *J Biol Chem* *251*, 4199–4207.

Hollingshead, S.K., Baril, L., Ferro, S., King, J., Coan, P., Briles, D.E., and Pneumococcal Proteins Epi Study, G. (2006). Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *Journal of medical microbiology* *55*, 215-221.

Hotze, E.M., and Tweten, R.K. (2012). Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. *Biochim Biophys Acta* *1818*, 1028–1038.

Huang, Y.J., Sethi, S., Murphy, T., Nariya, S., Boushey, H.A., and Lynch, S.V. (2014). Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* *52*, 2813–2823.

Hupp, S., Heimeroth, V., Wippel, C., Fortsch, C., Ma, J., Mitchell, T.J., and Iliev, A.I. (2012). Astrocytic tissue remodeling by the meningitis neurotoxin pneumolysin facilitates pathogen tissue penetration and produces interstitial brain edema. *Glia* *60*, 137–146.

Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., and Brown, J.S. (2010). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* *78*, 704–715.

Iannelli, F., Oggioni, M.R., and Pozzi, G. (2002). Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* *284*, 63–71.

Imamura, Y., Higashiyama, Y., Tomono, K., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Ohno, H., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J.-i., *et al.* (2005). Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* *49*, 1377–1380.

Iwanaga, N., Nakamura, S., Oshima, K., Kajihara, T., Takazono, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Sugawara, A., Sunazuka, T., *et al.* (2015). Macrolides Promote CCL2-Mediated Macrophage Recruitment and Clearance of Nasopharyngeal Pneumococcal Colonization in Mice. *The Journal of infectious diseases* *212*, 1150-1159.

Jacobs, M.R., Koornhof, H.J., Robins-Browne, R.M., Stevenson, C.M., Vermaak, Z.A., Freiman, I., Miller, G.B., Witcomb, M.A., Isaacson, M., Ward, J.I., *et al.* (1978). Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* *299*, 735-740.

Jado, I., López, R., García, E., Fenoll, A., Casal, J., and García, P. (2003). Phage lytic enzymes as therapy of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* *52*, 967-973.

Jansen, W.T., Bolm, M., Balling, R., Chhatwal, G.S., and Schnabel, R. (2002). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* *70*, 5202-5207.

Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G., and Björck, L. (2000). Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *The Journal of biological chemistry* *275*, 37257-37263.

Jarva, H., Janulczyk, R., Hellwage, J., Zipfel, P.F., Björck, L., and 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*, 1886-1894.

Jeong, J.K., Kwon, O., Lee, Y.M., Oh, D.-B., Lee, J.M., Kim, S., Kim, E.-H., Le, T.N., Rhee, D.-K., and Kang, H.A. (2009). Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface β -galactosidase with specific hydrolysis activity for the Gal β 1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *J Bacteriol* *191*, 3011-3023.

Johansson, P.J., Sternby, E., and Ursing, B. (1992). Septicemia in granulocytopenic patients: a shift in bacterial etiology. *Scandinavian journal of infectious diseases* *24*, 357-360.

Johnson, M.K., Hamon, D., and Drew, G.K. (1982). Isolation and characterization of pneumolysin-negative mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *37*, 837-839.

Johnston, J.W., Myers, L.E., Ochs, M.M., Benjamin, W.H., Jr., Briles, D.E., and Hollingshead, S.K. (2004). Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect Immun* *72*, 5858-5867.

Jomaa, M., Terry, S., Hale, C., Jones, C., Dougan, G., and Brown, J. (2006). Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* *24*, 5133-5139.

Jomaa, M., Yuste, J., Paton, J.C., Jones, C., Dougan, G., and Brown, J.S. (2005). Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *73*, 6852-6859.

Jung, E., Feldhoff, R.C., Walz, B.M., Drehs, M.M., Buchheit, J.Q., and Lassiter, H.A. (1998). Complement component C9 enhances the capacity of beta-lactam antibiotics to kill *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *Am J Med Sci* *315*, 307-313.

Kadioglu, A., Taylor, S., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T.J., and Andrew, P.W. (2002). Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* *70*, 2886-2890.

Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* *6*, 288-301.

Kaetzel, C.S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* *206*, 83-99.

Kamboj, K.K., Kirchner, H.L., Kimmel, R., Greenspan, N.S., and Schreiber, J.R. (2003). Significant variation in serotype-specific immunogenicity of the seven-valent *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-CRM197 conjugate vaccine occurs despite vigorous T cell help induced by the carrier protein. *The Journal of infectious diseases* *187*, 1629-1638.

Kamerling, J.P. (2000). Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. In *Streptococcus pneumoniae Molecular Biology & Mechanisms of Disease*, A. Tomasz, ed. (Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc), pp. 81-114.

Kamtchoua, T., Bologna, M., Hopfer, R., Neveu, D., Hu, B., Sheng, X., Corde, N., Pouzet, C., Zimmermann, G., and Gurunathan, S. (2013). Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. *Vaccine* *31*, 327-333.

- Kang, Y.-S., Do, Y., Lee, H.-K., Park, S.H., Cheong, C., Lynch, R.M., Loeffler, J.M., Steinman, R.M., and Park, C.G. (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* *125*, 47–58.
- Kasahara, K., Maeda, K., Mikasa, K., Uno, K., Takahashi, K., Konishi, M., Yoshimoto, E., Murakawa, K., Kita, E., and Kimura, H. (2005). Clonal dissemination of macrolide-resistant and penicillin-susceptible serotype 3 and penicillin-resistant Taiwan 19F-14 and 23F-15 *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan: a pilot surveillance study. *Journal of clinical microbiology* *43*, 1640-1645.
- Kaur, R., Surendran, N., Ochs, M., and Pichichero, M.E. (2014). Human antibodies to PhtD, PcpA, and Ply reduce adherence to human lung epithelial cells and murine nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *82*, 5069–5075.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L.S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H., and Sørensen, U.B.S. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PloS one* *3*, e2683.
- Kim, J.O., Romero-Steiner, S., Sørensen, U.B.S., Blom, J., Carvalho, M., Barnard, S., Carlone, G., and Weiser, J.N. (1999). Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *67*, 2327–2333.
- Kim, J.O., and 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*, 368–377.
- King, S.J. (2010). Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol Oral Microbiol* *25*, 15–24.
- King, S.J., Hippe, K.R., and Weiser, J.N. (2006). Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* *59*, 961–974.
- Kirkham, L.-A.S., Kerr, A.R., Douce, G.R., Paterson, G.K., Dilts, D.A., Liu, D.-F., and Mitchell, T.J. (2006). Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. *Infect Immun* *74*, 586–593.
- Kislak, J.W., Razavi, M.B., Daly, A.K., and Finland, M. (1965). Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* *250*, 261–268.
- Kjaer, T.R., Hansen, A.G., Sørensen, U.B.S., Holm, A.T., Sørensen, G.L., Jensenius, J.C., and Thiel, S. (2013). M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19B and 19C and of a *Streptococcus mitis* strain. *Infect Immun* *81*, 452–459.
- Klein, E. (1884). Micro-organisms and disease. *The Practitioner* *XXXII*, 321–352.
- Koedel, U. (2009). Toll-like receptors in bacterial meningitis. *Curr Top Microbiol Immunol* *336*, 15–40.
- Koedel, U., Scheld, W.M., and Pfister, H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* *2*, 721–736.
- Kono, M., Hotomi, M., Hollingshead, S.K., Briles, D.E., and Yamanaka, N. (2011). Maternal immunization with pneumococcal surface protein A protects against pneumococcal infections among derived offspring. *PloS one* *6*, e27102.
- Koppel, E.A., Wieland, C.W., van den Berg, V.C., Litjens, M., Florquin, S., van Kooyk, Y., van der Poll, T., and Geijtenbeek, T.B. (2005). Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* *35*, 2962–2969.
- Krup, A., Sørensen, U.B.S., Matsushita, M., Jensenius, J.C., and Thiel, S. (2005). Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect Immun* *73*, 1052–1060.
- Kropinski, A.M. (2006). Phage Therapy - Everything Old is New Again. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada* *17*, 297-306.
- Kusuma, C., Jadanova, A., Chanturiya, T., and Kokai-Kun, J.F. (2007). Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *51*, 475-482.
- Kutter, E.y.S., A. (2005). *Bacteriophages Biology and Applications.*, Boca Raton edn.
- Lacks, S.A. (1977). Binding and entry of DNA in bacterial transformation. In *Microbial interaction*, J.L. Reiss, ed. (Chapman and Hall London), pp. 179-232.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambris, J.D., Ricklin, D., and Geisbrecht, B.V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6, 132–142.
- Lanie, J.A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I., and Winkler, M.E. (2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* 189, 38–51.
- Lee, C.J., Lock, R.A., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., Hansman, D., and Paton, J.C. (1994). Protection of infant mice from challenge with *Streptococcus pneumoniae* type 19F by immunization with a type 19F polysaccharide--pneumolysoid conjugate. *Vaccine* 12, 875-878.
- Leroux-Roels, G., Maes, C., De Boever, F., Traskine, M., Ruggeberg, J.U., and Borys, D. (2014). Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. *Vaccine* 32, 6838-6846.
- Lesinski, G.B., and Westerink, M.A. (2001). Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr Drug Targets Infect Disord* 1, 325–334.
- Li, J., Glover, D.T., Szalai, A.J., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2007). PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun* 75, 5877–5885.
- Li, Q., Li, Y.X., Stahl, G.L., Thurman, J.M., He, Y., and 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, 2578–2585.
- Libman, E. (1905). A pneumococcus producing a peculiar form of hemolysis. *Proc N Y Pathol Soc* V, 168.
- Lichenstein, H.S., Hastings, A.E., Langley, K.E., Mendiaz, E.A., Rohde, M.F., Elmore, R., and Zukowski, M.M. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the N-acetylmuramidase M1-encoding gene from *Streptomyces globisporus*. *Gene* 88, 81-86.
- Liñares, J., Ardanuy, C., Pallares, R., and Fenoll, A. (2010). Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 16, 402–410.
- Lister, F.S. (1916). An experimental study of prophylactic inoculation against pneumococcal infection in the rabbit and in man. *Pub S Afr Inst Med Res* 8, 231–287.
- Lister, F.S. (1917). Prophylactic inoculation of man against pneumococcal infections, and more particularly against lobar pneumonia. . *Pub S Afr Inst Med Res* 10, 304–322.
- Littorin, N., Ahl, J., Udden, F., Resman, F., and Riesbeck, K. (2016). Reduction of *Streptococcus pneumoniae* in upper respiratory tract cultures and a decreased incidence of related acute otitis media following introduction of childhood pneumococcal conjugate vaccines in a Swedish county. *BMC infectious diseases* 16, 407.
- Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1992). Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 12, 137-143.
- Lock, R.A., Paton, J.C., and Hansman, D. (1988). Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 5, 461-467.
- Loeffler, J.M., Djurkovic, S., and Fischetti, V.A. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 71, 6199–6204.
- Loeffler, J.M., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294, 2170–2172.
- Long, J.P., Tong, H.H., and DeMaria, T.F. (2004). Immunization with native or recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model. *Infection and immunity* 72, 4309-4313.
- López, R., and García, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* 28, 553–580.

- López, R., González, M.P., García, E., García, J.L., and García, P. (2000). Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res Microbiol* 151, 437–443.
- Lottenbach, K.R., Mink, C.M., Barenkamp, S.J., Anderson, E.L., Homan, S.M., and Powers, D.C. (1999). Age-associated differences in immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 subclass antibodies to pneumococcal polysaccharides following vaccination. *Infection and immunity* 67, 4935–4938.
- Low, D.E. (2005). Fluoroquinolone-resistant pneumococci: maybe resistance isn't futile? *Clin Infect Dis* 40, 236–238.
- Lu, T.K., and Koeris, M.S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current opinion in microbiology* 14, 524–531.
- Luján, M., Gallego, M., Belmonte, Y., Fontanals, D., Vallès, J., Lisboa, T., and Rello, J. (2010). Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteremic pneumonia. *Eur Respir J* 36, 1073–1079.
- Lukacik, P., Barnard, T.J., Keller, P.W., Chaturvedi, K.S., Seddiki, N., Fairman, J.W., Noinaj, N., Kirby, T.L., Henderson, J.P., Steven, A.C., *et al.* (2012). Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 9857–9862.
- Lund, E., and Henrichsen, J. (1978). Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol* 12, 241–262.
- Lyll, N.W., and Odell, H.R. (1939). Production and standardization of diagnostic antipneumococcus sera. *Am J Hyg* 29, 103–106.
- Llull, D., López, R., and García, E. (2001). Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr Mol Med* 1, 475–491.
- MacLeod, C.M., Hodges, R.G., Heidelberger, M., and Bernhard, W.G. (1945). Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 82, 445–465.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R.P., and van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr Opin Biotechnol* 22, 157–163.
- Majcherczyk, P.A., Langen, H., Heumann, D., Fountoulakis, M., Glauser, M.P., and Moreillon, P. (1999). Digestion of *Streptococcus pneumoniae* cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *J Biol Chem* 274, 12537–12543.
- Manco, S., Herson, F., Yesilkaya, H., Paton, J.C., Andrew, P.W., and Kadioglu, A. (2006). Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infection and immunity* 74, 4014–4020.
- Mann, B., Thornton, J., Heath, R., Wade, K.R., Tweten, R.K., Gao, G., El Kasmi, K., Jordan, J.B., Mitrea, D.M., Kriwacki, R., *et al.* (2014). Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. *The Journal of infectious diseases* 209, 1116–1125.
- Marra, A., Lawson, S., Asundi, J.S., Brigham, D., and Hromockyj, A.E. (2002). In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148, 1483–1491.
- Marrack, P., McKee, A.S., and Munks, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature reviews Immunology* 9, 287–293.
- Marriott, H.M., and Dockrell, D.H. (2007). The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Experimental lung research* 33, 493–505.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J., and Dockrell, D.H. (2008). Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med* 8, 497–509.
- Martín-Galiano, A.J., Balsalobre, L., Fenoll, A., and de la Campa, A.G. (2003). Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3187–3194.
- Martin, C., Burgel, P.-R., Lepage, P., Andréjak, C., de Blic, J., Bourdin, A., Brouard, J., Chanez, P., Dalphin, J.-C., Deslée, G., *et al.* (2015). Host–microbe interactions in distal airways: relevance to chronic airway diseases. *Eur Respir Rev* 24, 78–91.
- Martín, V., Mañes-Lázaro, R., Rodríguez, J.M., and Maldonado-Barragán, A. (2011). *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1048–1052.

Martinez, J.E., Romero-Steiner, S., Pilishvili, T., Barnard, S., Schinsky, J., Goldblatt, D., and Carlone, G.M. (1999). A flow cytometric opsonophagocytic assay for measurement of functional antibodies elicited after vaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 581–586.

Masschalck, B., and Michiels, C.W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical reviews in microbiology* 29, 191-214.

Mattey, M., and Spencer, J. (2008). Bacteriophage therapy--cooked goose or phoenix rising? *Curr Opin Biotechnol* 19, 608-612.

Maus, U.A., Srivastava, M., Paton, J.C., Mack, M., Everhart, M.B., Blackwell, T.S., Christman, J.W., Schlöndorff, D., Seeger, W., and Lohmeyer, J. (2004). Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol* 173, 1307–1312.

Maynard, G.D. (1915). Pneumonia inoculation experiment no III. *Med J S Afr* 11, 36–39.

McAllister, L.J., Tseng, H.-J., Ogunniyi, A.D., Jennings, M.P., McEwan, A.G., and Paton, J.C. (2004). Molecular analysis of the *psa* permease complex of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 53, 889–901.

McCarty, M., and Avery, O.T. (1946). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J Exp Med* 83, 89–96.

McCullers, J.A. (2006). Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 19, 571–582.

McCullers, J.A., Iverson, A.R., McKeon, R.M., and Murray, P.J. (2008). The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza. *Scand J Infect Dis* 40, 11–17.

McCullers, J.A., Karlstrom, A., Iverson, A.R., Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2007). Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS pathogens* 3, e28.

McCullers, J.A., and Tuomanen, E.I. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci* 6, D877–D889.

McDaniel, L.S., Scott, G., Widenhofer, K., Carroll, J.M., and Briles, D.E. (1986). Analysis of a surface protein of *Streptococcus pneumoniae* recognised by protective monoclonal antibodies. *Microbial pathogenesis* 1, 519-531.

McDaniel, L.S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W.R., and Briles, D.E. (1987). Use of an insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J Exp Med* 165, 381–394.

Melin, M., Coan, P., and Hollingshead, S. (2012). Development of cross-reactive antibodies to the proline-rich region of pneumococcal surface protein A in children. *Vaccine* 30, 7157-7160.

Mellroth, P., Sandalova, T., Kikhney, A., Vilaplana, F., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Normark, S., Svergun, D., Henriques-Normark, B., *et al.* (2014). Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 5, e01120-01113.

Mestas, J., and Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology* 172, 2731-2738.

Michon, F., Fusco, P.C., Minetti, C.A., Laude-Sharp, M., Uitz, C., Huang, C.H., D'Ambra, A.J., Moore, S., Remeta, D.P., Heron, I., *et al.* (1998). Multivalent pneumococcal capsular polysaccharide conjugate vaccines employing genetically detoxified pneumolysin as a carrier protein. *Vaccine* 16, 1732-1741.

Mitchell, T.J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 1, 219–230.

Miyaji, E.N., Oliveira, M.L., Carvalho, E., and Ho, P.L. (2013). Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 3303-3326.

Moens, L., Van Hoeyveld, E., Peetermans, W.E., De Boeck, C., Verhaegen, J., and Bossuyt, X. (2006). Mannose-binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum Immunol* 67, 605–611.

Monterroso, B., López-Zumel, C., García, J.L., Sáiz, J.L., García, P., Campillo, N.E., and Menéndez, M. (2005). Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme. *Biochem J* 391, 41–49.

- Monterroso, B., Sáiz, J.L., García, P., García, J.L., and Menéndez, M. (2008). Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1. *J Biol Chem* *283*, 28618–28628.
- Moore, L.J., Pridmore, A.C., Dower, S.K., and Read, R.C. (2003). Penicillin enhances the Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory activity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* *188*, 1040–1048.
- Morales, M. (2014). Estudios moleculares del gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae*, y otros estreptococos relacionados, y su aplicación en epidemiología. In Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología III (Madrid: Universidad Complutense de Madrid).
- Morales, M., García, P., de la Campa, A.G., Liñares, J., Ardanuy, C., and García, E. (2010). Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene encoding the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* *192*, 2624–2632.
- Moreillon, P., and Majcherczyk, P.A. (2003). Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* *35*, 632–641.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., and Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* *430*, 242–249.
- Morey, P., Cano, V., Martí-Llitas, P., López-Gómez, A., Regueiro, V., Saus, C., Bengoechea, J.A., and Garmendia, J. (2011). Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* *157*, 234–250.
- Moscoso, M., Domenech, M., and 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*, 1052–1064.
- Moscoso, M., Domenech, M., and García, E. (2011). Vancomycin tolerance in Gram-positive cocci. *Environ Microbiol Rep* *3*, 640–650.
- Moscoso, M., García, E., and López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* *188*, 7785–7795.
- Moscoso, M., Obregón, V., López, R., García, J.L., and García, E. (2005). Allelic variation of the polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl Environ Microbiol* *71*, 8706–8713.
- Moschioni, M., De Angelis, G., Harfouche, C., Bizzarri, E., Filippini, S., Mori, E., Mancuso, G., Doro, F., Barocchi, M.A., Ruggiero, P., *et al.* (2012). Immunization with the RrgB321 fusion protein protects mice against both high and low pilus-expressing *Streptococcus pneumoniae* populations. *Vaccine* *30*, 1349–1356.
- Moschioni, M., Emolo, C., Biagini, M., Maccari, S., Pansegrau, W., Donati, C., Hilleringmann, M., Ferlenghi, I., Ruggiero, P., Sinisi, A., *et al.* (2010). The two variants of the *Streptococcus pneumoniae* pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection *in vivo*. *Infect Immun* *78*, 5033–5042.
- Mosser, J.L., and 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*, 287–298.
- Musher, D.M., Watson, D.A., and Baughn, R.E. (2000). Genetic control of the immunologic response to pneumococcal capsular polysaccharides. *Vaccine* *19*, 623–627.
- Mwenya, D.M., Charalambous, B.M., Phillips, P.P., Mwansa, J.C., Batt, S.L., Nunn, A.J., Walker, S., Gibb, D.M., and Gillespie, S.H. (2010). Impact of cotrimoxazole on carriage and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in HIV-infected children in Zambia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *54*, 3756–3762.
- 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., and Weiser, J.N. (2007). Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* *75*, 83–90.

Nelson, D., Loomis, L., and 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 USA* *98*, 4107–4112.

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.

Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* *67*, 686–723.

Nuorti, J.P., Butler, J.C., Farley, M.M., Harrison, L.H., McGeer, A., Kolczak, M.S., Breiman, R.F., and Active Bacterial Core Surveillance Team (2000). Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med* *342*, 681–689.

O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., *et al.* (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* *374*, 893–902.

O'Toole, R.D., Goode, L., and Howe, C. (1971). Neuraminidase activity in bacterial meningitis. *The Journal of clinical investigation* *50*, 979–985.

Odutola, A., Ota, M.O., Ogundare, E.O., Antonio, M., Owiafe, P., Worwui, A., Greenwood, B., Alderson, M., Traskine, M., Verlant, V., *et al.* (2016). Reactogenicity, safety and immunogenicity of a protein-based pneumococcal vaccine in Gambian children aged 2-4 years: A phase II randomized study. *Human vaccines & immunotherapeutics* *12*, 393-402.

Ogunniyi, A.D., Folland, R., Briles, D.E., Hollingshead, S.K., and Paton, J.C. (2000). Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *68*, 3028–3033.

Ogunniyi, A.D., Giammarinaro, P., and Paton, J.C. (2002). The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed in vivo. *Microbiology* *148*, 2045–2053.

Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Briles, D.E., Cook, J., and Paton, J.C. (2007). Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* *75*, 350–357.

Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Mahdi, L.K., Cook, J., Gordon, D.L., Sadlon, T.A., and Paton, J.C. (2009). Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J* *23*, 731–738.

Ogunniyi, A.D., Mahdi, L.K., Trappetti, C., Verhoeven, N., Mermans, D., Van der Hoek, M.B., Plumpre, C.D., and Paton, J.C. (2012). Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by in vivo transcriptomic analysis. *Infection and immunity* *80*, 3268-3278.

Ogunniyi, A.D., Woodrow, M.C., Poolman, J.T., and Paton, J.C. (2001). Protection against *Streptococcus pneumoniae* elicited by immunization with pneumolysin and CbpA. *Infection and immunity* *69*, 5997-6003.

Olarte, L., Kaplan, S.L., Barson, W.J., Romero, J.R., Lin, P.L., Tan, T.Q., Hoffman, J.A., Bradley, J.S., Givner, L.B., Mason, E.O., *et al.* (2016). Emergence of Multidrug-resistant Pneumococcal Serotype 35B among U.S. Children. *Journal of clinical microbiology*.

Oliveira, M.L.S., Arêas, A.P.M., Campos, I.B., Monedero, V., Perez-Martínez, G., Miyaji, E.N., Leite, L.C.C., Aires, K.A., and Lee Ho, P. (2006). Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes and Infection* *8*, 1016-1024.

Opie, E.L., and Freund, J. (1937). An Experimental Study of Protective Inoculation with Heat Killed Tubercle Bacilli. *The Journal of experimental medicine* *66*, 761-788.

Orihuela, C.J., Gao, G., Francis, K.P., Yu, J., and Tuomanen, E.I. (2004). Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis* *190*, 1661–1669.

Orihuela, C.J., Mahdavi, J., Thornton, J., Mann, B., Wooldridge, K.G., Abouseada, N., Oldfield, N.J., Self, T., Ala'Aldeen, D.A.A., and Tuomanen, E.I. (2009). Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest* *119*, 1638–1646.

Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., and Lan, C.Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of applied microbiology* *104*, 1-13.

Park, I.H., Geno, K.A., Yu, J., Oliver, M.B., Kim, K.-H., and Nahm, M.H. (2015). Genetic, biochemical, and serological characterization of a new pneumococcal serotype, 6H, and generation of a pneumococcal strain producing three different capsular repeat units. *Clin Vaccine Immunol* *22*, 313–318.

Parsons, H.K., and Dockrell, D.H. (2002). The burden of invasive pneumococcal disease and the potential for reduction by immunisation. *Int J Antimicrob Agents* *19*, 85–93.

Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A., and Huang, D.B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol* *62*, 1506–1516.

Pasteur (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, P.B., Diaz, M.C.G., Bennett, J.E., and Attia, M.W. (2007). Clinical features of bacterial conjunctivitis in children. *Acad Emerg Med* *14*, 1–5.

Paton, J.C., Berry, A.M., and Lock, R.A. (2000). Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. In *Streptococcus pneumoniae Molecular Biology & Mechanisms of Disease*, A. Tomasz, ed. (Larchmont, NY: Mary Ann Liebert), pp. 261-270.

Paton, J.C., Lock, R.A., and Hansman, D.J. (1983). Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* *40*, 548-552.

Paton, J.C., Lock, R.A., Lee, C.J., Li, J.P., Berry, A.M., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Hansman, D., and Boulnois, G.J. (1991). Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infection and immunity* *59*, 2297-2304.

Paton, J.C., Rowan-Kelly, B., and Ferrante, A. (1984). Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* *43*, 1085–1087.

Pelton, S.I., Weycker, D., Farkouh, R.A., Strutton, D.R., Shea, K.M., and Edelsberg, J. (2014). Risk of pneumococcal disease in children with chronic medical conditions in the era of pneumococcal conjugate vaccine. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* *59*, 615-623.

Perciani, C.T., Barazzone, G.C., Goulart, C., Carvalho, E., Cabrera-Crespo, J., Goncalves, V.M., Leite, L.C., and Tanizaki, M.M. (2013). Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. *Clinical and vaccine immunology : CVI* *20*, 858-866.

Pettigrew, M.M., Fennie, K.P., York, M.P., Daniels, J., and Ghaffar, F. (2006). Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect Immun* *74*, 3360–3365.

Pichichero, M.E., Kaur, R., Casey, J.R., Xu, Q., Almudevar, A., and Ochs, M. (2012). Antibody response to *Streptococcus pneumoniae* proteins PhtD, LytB, PcpA, PhtE and Ply after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Hum Vaccin Immunother* *8*, 799–805.

Pilishvili, T., Zell, E.R., Farley, M.M., Schaffner, W., Lynfield, R., Nyquist, A.C., Vazquez, M., Bennett, N.M., Reingold, A., Thomas, A., *et al.* (2010). Risk factors for invasive pneumococcal disease in children in the era of conjugate vaccine use. *Pediatrics* *126*, e9-17.

Plumptre, C.D., Ogunniyi, A.D., and Paton, J.C. (2012). Polyhistidine triad proteins of pathogenic streptococci. *Trends Microbiol* *20*, 485–493.

Plumptre, C.D., Ogunniyi, A.D., and Paton, J.C. (2013). Vaccination against *Streptococcus pneumoniae* Using Truncated Derivatives of Polyhistidine Triad Protein D. *PLoS one* *8*, e78916.

Pomat, W.S., Lehmann, D., Sanders, R.C., Lewis, D.J., Wilson, J., Rogers, S., Dyke, T., and Alpers, M.P. (1994). Immunoglobulin G antibody responses to polyvalent pneumococcal vaccine in children in the highlands of Papua New Guinea. *Infection and immunity* *62*, 1848-1853.

Poolman, J., Kriz, P., Feron, C., Di-Paolo, E., Henckaerts, I., Miseur, A., Wauters, D., Prymula, R., and Schuerman, L. (2009). Pneumococcal serotype 3 otitis media, limited effect of polysaccharide conjugate immunisation and strain characteristics. *Vaccine* *27*, 3213–3222.

Porat, N., Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Shuval, D.S., Treffer, R., Segev, O., Hanage, W.P., and Dagan, R. (2006). The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis* 194, 689–696.

Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M., Kim, K.S., Jenkinson, H.F., Nau, R., and Hammerschmidt, S. (2005). PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* 73, 2680–2689.

Preston, J.A., and Dockrell, D.H. (2008). Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiol* 3, 205–221.

Price, K.E., and Camilli, A. (2009). Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 191, 2163–2168.

Price, K.E., Greene, N.G., and Camilli, A. (2012). Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 194, 3651–3660.

Principi, N., Preti, V., Gaspari, S., Colombini, A., Zecca, M., Terranova, L., Cefalo, M.G., Ierardi, V., Pelucchi, C., and Esposito, S. (2016). *Streptococcus pneumoniae* pharyngeal colonization in school-age children and adolescents with cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics* 12, 301-307.

Prymula, R., Pazdiora, P., Traskine, M., Ruggeberg, J.U., and Borys, D. (2014). Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: a phase II randomized clinical trial. *Vaccine* 32, 3025-3034.

Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64, 672-693.

Putnam, S.D., Gray, G.C., Biedenbach, D.J., and Jones, R.N. (2000). Pharyngeal colonization prevalence rates for *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in a respiratory chemoprophylaxis intervention study using azithromycin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6, 2-8.

Radin, J.N., Orihuela, C.J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P.J., and Tuomanen, E.I. (2005). β -arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 73, 7827-7835.

Rake, G., McKee, C.M., Hamre, D.M., and Houck, C.L. (1944). Studies on penicillin. II. Observations on therapeutic activity and toxicity. *J Immunol* 48, 271–289.

Ramirez, M., Severina, E., and Tomasz, A. (1999). A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 181, 3618–3625.

Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E., and 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., and Yuste, J. (2012a). 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., Rodríguez-Sosa, C., Díez-Martínez, R., Giménez, M.-J., Olmedillas, E., García, P., García, E., Aguilar, L., and Yuste, J. (2012b). Macrolides and β -lactams antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 5534–5540.

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., *et al.* (2015). Pleiotropic effects of the cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun* 83, 591–603.

Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., de Andres, B., Gonzalez-Tajuelo, R., Domenech, M., Gonzalez-Camacho, F., Sanchez-Madrid, F., Brown, J.S., Garcia, E., and Yuste, J. (2016). PSGL-1 on Leukocytes is a Critical Component of the Host Immune Response against Invasive Pneumococcal Disease. *PLoS pathogens* 12, e1005500.

Rashel, M., Uchiyama, J., Ujihara, T., Uehara, Y., Kuramoto, S., Sugihara, S., Yagyu, K., Muraoka, A., Sugai, M., Hiramatsu, K., *et al.* (2007). Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *The Journal of infectious diseases* 196, 1237-1247.

Reed, S.G., Orr, M.T., and Fox, C.B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature medicine* *19*, 1597-1608.

Reinert, R.R., Jacobs, M.R., and Kaplan, S.L. (2010). Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine* *28*, 4249-4259.

Rello, J., Lisboa, T., Lujan, M., Gallego, M., Kee, C., Kay, I., Lopez, D., Waterer, G.W., and Group, D.N.-N.S. (2009). Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* *136*, 832-840.

Ren, B., Szalai, A.J., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2004). Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infection and immunity* *72*, 114-122.

Ren, B., Szalai, A.J., Thomas, O., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2003). Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* *71*, 75-85.

Ricci, S., Janulczyk, R., Gerlini, A., Braione, V., Colomba, L., Iannelli, F., Chiavolini, D., Oggioni, M.R., Björck, L., and Pozzi, G. (2011). The factor H-binding fragment of PspC as a vaccine antigen for the induction of protective humoral immunity against experimental pneumococcal sepsis. *Vaccine* *29*, 8241-8249.

Rijneveld, A.W., Weijer, S., Florquin, S., Speelman, P., Shimizu, T., Ishii, S., and van der Poll, T. (2004). Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis* *189*, 711-716.

Ring, A., Weiser, J.N., and Tuomanen, E.I. (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* *102*, 347-360.

Rioux, S., Neyt, C., Di Paolo, E., Turpin, L., Charland, N., Labbé, S., Mortier, M.-C., Mitchell, T.J., Feron, C., Martin, D., *et al.* (2011). Transcriptional regulation, occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* *157*, 336-348.

Ritchie, N.D., Mitchell, T.J., and Evans, T.J. (2012). What is different about serotype 1 pneumococci? *Future Microbiol* *7*, 33-46.

Robinson, J.M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* *131*, 465-469.

Roche, H., Ren, B., McDaniel, L.S., Hakansson, A., and Briles, D.E. (2003). Relative roles of genetic background and variation in PspA in the ability of antibodies to PspA to protect against capsular type 3 and 4 strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* *71*, 4498-4505.

Rodgers, F.G., Tzianabos, A.O., and Elliott, T.S.J. (1990). The effect of antibiotics that inhibit cell-wall, protein, and DNA synthesis on the growth and morphology of *Legionella pneumophila*. *J Med Microbiol* *31*, 37-44.

Rodriguez-Avial, I., Ramos, B., Rios, E., Cercenado, E., Ordobas, M., Sanz, J.C., and Madrid *Streptococcus pneumoniae* Microbiological, G. (2011). Clonal spread of levofloxacin-resistant streptococcus pneumoniae invasive isolates in Madrid, Spain, 2007 to 2009. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *55*, 2469-2471.

Rodríguez-Cerrato, V., García, P., del Prado, G., García, E., Gracia, M., Huelves, L., Ponte, C., López, R., and Soriano, F. (2007). *In vitro* interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal), cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Antimicrob Chemother* *60*, 1159-1162.

Rodriguez, J.L., Dalia, A.B., and Weiser, J.N. (2012). Increased chain length promotes pneumococcal adherence and colonization. *Infect Immun* *80*, 3454-3459.

Rohwer, F., and Edwards, R. (2002). The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* *184*, 4529-4535.

Romero-Steiner, S., Libutti, D., Pais, L.B., Dykes, J., Anderson, P., Whitin, J.C., Keyserling, H.L., and 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*, 415-422.

Romero, P., Croucher, N.J., Hiller, N.L., Hu, F.Z., Ehrlich, G.D., Bentley, S.D., García, E., and Mitchell, T.J. (2009). Comparative genomic analysis of ten *Streptococcus pneumoniae* temperate bacteriophages. *J Bacteriol* *191*, 4854-4862.

Ronda, C., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M., and López, R. (1987). Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* *164*, 621–624.

Rosado, M.M., Gesualdo, F., Marcellini, V., Di Sabatino, A., Corazza, G.R., Smacchia, M.P., Nobili, B., Baronci, C., Russo, L., Rossi, F., *et al.* (2013). Preserved antibody levels and loss of memory B cells against pneumococcus and tetanus after splenectomy: tailoring better vaccination strategies. *European journal of immunology* *43*, 2659-2670.

Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, H.R. (1997). Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* *25*, 819–829.

Rounioja, S., Saralahti, A., Rantala, L., Parikka, M., Henriques-Normark, B., Silvennoinen, O., and Rämetsä, M. (2012). Defense of zebrafish embryos against *Streptococcus pneumoniae* infection is dependent on the phagocytic activity of leukocytes. *Dev Comp Immunol* *36*, 342–348.

Rubins, J.B., Charboneau, D., Paton, J.C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., and Janoff, E.N. (1995). Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest* *95*, 142–150.

Rupprecht, T.A., Angele, B., Klein, M., Heesemann, J., Pfister, H.-W., Botto, M., and Koedel, U. (2007). Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *J Immunol* *178*, 1861–1869.

Russell, H., Tharpe, J.A., Wells, D.E., White, E.H., and Johnson, J.E. (1990). Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology* *28*, 2191-2195.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sampson, J.S., Furlow, Z., Whitney, A.M., Williams, D., Facklam, R., and Carlone, G.M. (1997). Limited diversity of *Streptococcus pneumoniae* *psaA* among pneumococcal vaccine serotypes. *Infection and immunity* *65*, 1967-1971.

Sánchez-Puelles, J.M., Ronda, C., García, J.L., García, P., López, R., and García, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* *158*, 289–293.

Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., and García, E. (1992). Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur J Biochem* *203*, 153–159.

Sanz, J.M., and García, J.L. (1990). Structural studies of the lysozyme coded by the pneumococcal phage Cp-1. Conformational changes induced by choline. *Eur J Biochem* *187*, 409–416.

Sato, K., Quartey, M.K., Liebler, C.L., Le, C.T., and Giebink, G.S. (1996). Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun* *64*, 1140–1145.

Schmelcher, M., Powell, A.M., Camp, M.J., Pohl, C.S., and Donovan, D.M. (2015). Synergistic streptococcal phage lambdaSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Applied microbiology and biotechnology* *99*, 8475-8486.

Schmidt, L.H., and Sesler, C.L. (1943). Development of resistance to penicillin by pneumococci. *Proc Soc Exp Biol Med* *52*, 353–357.

Schuch, R., Fischetti, V.A., and Nelson, D.C. (2009). A genetic screen to identify bacteriophage lysins. *Methods in molecular biology* *502*, 307-319.

Schuch, R., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* *418*, 884–889.

Schwaeble, W.J., and Reid, K.B.M. (1999). Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? *Immunol Today* *20*, 17–21.

Sebert, M.E., Patel, K.P., Plotnick, M., and Weiser, J.N. (2005). Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *J Bacteriol* *187*, 3969–3979.

Sethi, S., and Murphy, T.F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* *359*, 2355–2365.

Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., Jr., and Briles, D.E. (2004). PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun* 72, 5031–5040.

Shea, K.M., Edelsberg, J., Weycker, D., Farkouh, R.A., Strutton, D.R., and Pelton, S.I. (2014). Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open Forum Infect Dis* 1, ofu024.

Shelly, M.A., Jacoby, H., Riley, G.J., Graves, B.T., Pichichero, M., and Treanor, J.J. (1997). Comparison of pneumococcal polysaccharide and CRM197-conjugated pneumococcal oligosaccharide vaccines in young and elderly adults. *Infection and immunity* 65, 242-247.

Shimada, J., Moon, S.K., Lee, H.-Y., Takeshita, T., Pan, H., Woo, J.-I., Gellibolian, R., Yamanaka, N., and Lim, D.J. (2008). Lysozyme M deficiency leads to an increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*-induced otitis media. *BMC Infect Dis* 8, 134.

Simell, B., Auranen, K., Käyhty, H., Goldblatt, D., Dagan, R., O'Brien, K.L., and for the Pneumococcal Carriage Group (PneumoCarr) (2012). The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines* 11, 841–855.

Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30, 225–420.

Skinner, J.M., Indrawati, L., Cannon, J., Blue, J., Winters, M., MacNair, J., Pujar, N., Manger, W., Zhang, Y., Antonello, J., et al. (2011). Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine* 29, 8870–8876.

Skurnik, M., and Strauch, E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *Int J Med Microbiol* 296, 5–14.

Smith, H.W., and Huggins, M.B. (1982). Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Journal of general microbiology* 128, 307-318.

Smith, H.W., and Huggins, M.B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of general microbiology* 129, 2659-2675.

Soininen, A., Seppala, I., Nieminen, T., Eskola, J., and Kayhty, H. (1999). IgG subclass distribution of antibodies after vaccination of adults with pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine* 17, 1889-1897.

Sørensen, U.B., and Blom, J. (1992). Capsular polysaccharide is linked to the outer surface of type 6A pneumococcal cell walls. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 100, 891–893.

Soriano, F., Cafini, F., Aguilar, L., Tarragó, D., Alou, L., Giménez, M.-J., Gracia, M., Ponte, M.-C., Leu, D., Pana, M., et al. (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, 1234–1240.

Standish, A.J., and Weiser, J.N. (2009). Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol* 183, 2602–2609.

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, 781–783.

Subrt, N., Mesak, L.R., and Davies, J. (2011). Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 66, 979–984.

Swank, R.T., and Munkres, K.D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 39, 462–477.

Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E., Jr., Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J.G., and Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of, A. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42, 657-668.

Talkington, D.F., Brown, B.G., Tharpe, J.A., Koenig, A., and Russell, H. (1996). Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). *Microbial pathogenesis* 21, 17-22.

Tano, K., Grahn-Hakansson, E., Holm, S.E., and Hellstrom, S. (2000). Inhibition of OM pathogens by alpha-hemolytic streptococci from healthy children, children with SOM and children with rAOM. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 56, 185-190.

Teizo, F., Misao, M., and Yuichi, E. (2004). The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 198, 185–202.

Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S., Wessels, M.R., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Margarit, I., Read, T.D., *et al.* (2002). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12391–12396.

Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., *et al.* (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293, 498–506.

Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W., and Saibil, H.R. (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121, 247–256.

Tomasz, A. (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 157, 694–697.

Tong, H.H., Blue, L.E., James, M.A., and DeMaria, T.F. (2000). Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 68, 921–924.

Tong, H.H., James, M., Grants, I., Liu, X., Shi, G., and 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, 309–317.

Tong, H.H., Li, D., Chen, S., Long, J.P., and DeMaria, T.F. (2005). Immunization with recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase NanA protects chinchillas against nasopharyngeal colonization. *Infection and immunity* 73, 7775-7778.

Tong, H.H., Li, Y.X., Stahl, G.L., and 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, 976–983.

Trouw, L.A., and Daha, M.R. (2011). Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* 138, 35–37.

Tseng, H.-J., McEwan, A.G., Paton, J.C., and Jennings, M.P. (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* 70, 1635–1639.

Tu, A.-H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., and Szalai, A.J. (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67, 4720–4724.

Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., and Tomasz, A. (1985a). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 151, 859-868.

Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B., and Zak, O. (1985b). The relative role of bacterial cell wall and capsule in induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 151, 535-540.

Turley, A.J., Gathmann, B., Bangs, C., Bradbury, M., Seneviratne, S., Gonzalez-Granado, L.I., Hackett, S., Kutukculer, N., Alachkar, H., Hambleton, S., *et al.* (2015). Spectrum and management of complement immunodeficiencies (excluding hereditary angioedema) across Europe. *Journal of clinical immunology* 35, 199-205.

Uchiyama, S., Carlin, A.F., Khosravi, A., Weiman, S., Banerjee, A., Quach, D., Hightower, G., Mitchell, T.J., Doran, K.S., and Nizet, V. (2009). The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med* 206, 1845–1852.

Uddin, S., Borrow, R., Haeney, M.R., Moran, A., Warrington, R., Balmer, P., and Arkwright, P.D. (2006). Total and serotype-specific pneumococcal antibody titres in children with normal and abnormal humoral immunity. *Vaccine* 24, 5637-5644.

UNICEF, and WHO (2006). Pneumonia: the forgotten killer of children, pp. http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf.

Urban, C.F., Lourido, S., and Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* 8, 1687–1696.

Vammen, B. (1939). Serological variants of pneumococcus types 9 and 10. *J Immunol* 37, 359–365.

van der Linden, M., Al-Lahham, A., Nicklas, W., and Reinert, R.R. (2009). Molecular characterization of pneumococcal isolates from pets and laboratory animals. *PLoS one* 4, e8286.

van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374, 1543–1556.

Veiga-Crespo, P., Ageitos, J.M., Poza, M., and Villa, T.G. (2007). Enzybiotics: a look to the future, recalling the past. *J Pharm Sci* 96, 1917–1924.

Vouillamoz, J., Entenza, J.M., Giddey, M., Fischetti, V.A., Moreillon, P., and Resch, G. (2013). Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 42, 416–421.

Walport, M.J. (2001a). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058–1066.

Walport, M.J. (2001b). Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344, 1140–1144.

Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J., and Keeble, A.H. (2010). Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 215, 1–11.

Wang, I.-N., Smith, D.L., and Young, R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* 54, 799–825.

Wang, X.-Y., Kilgore, P.E., Lim, K.A., Wang, S.-M., Lee, J., Deng, W., Mo, M.-Q., Nyambati, B., Ma, J.-C., Favorov, M.O., *et al.* (2011). Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2011, 146376.

Wardlaw, T., Salama, P., Johansson, E.W., and Mason, E. (2006). Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet* 368, 1048–1050.

Weichselbaum, A. (1886). Ueber die aetiologie der acuten lungen- und rippenfellentzündungen. *Med Jahrb* 82, 483–554.

Weinbauer, M.G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28, 127–181.

Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A.M., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Rückinger, S., Dagan, R., Adegbola, R., Cutts, F., Johnson, H.L., *et al.* (2010). Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 51, 692–699.

Weinberger, D.M., Malley, R., and Lipsitch, M. (2011). Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 378, 1962–1973.

Weiser, J.N., Bae, D., Fasching, C., Scamurra, R.W., Ratner, A.J., and Janoff, E.N. (2003). Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4215–4220.

Welch, H., Bormand, E.K., and Mickle, F.L. (1939). Preparation of diagnostic antipneumococcus sera. *Am J Public Health* 29, 35–42.

Wellmer, A., Zysk, G., Gerber, J., Kunst, T., Von Mering, M., Bunkowski, S., Eiffert, H., and Nau, R. (2002). Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* 70, 6504–6508.

Whalan, R.H., Funnell, S.G.P., Bowler, L.D., Hudson, M.J., Robinson, A., and Dowson, C.G. (2005). PiuA and PiaA, iron uptake lipoproteins of *Streptococcus pneumoniae*, elicit serotype independent antibody responses following human pneumococcal septicaemia. *FEMS immunology and medical microbiology* 43, 73–80.

Whatmore, A.M., and Dowson, C.G. (1999). The autolysin-encoding gene (*lytA*) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. *Infect Immun* 67, 4551–4556.

WHO (2007). Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization — WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 82, 93–104.

WHO (2009). Global literature review of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* invasive disease among children less than five years of age, 1980–2005, pp. http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_IVB_2009.2002_eng.pdf.

Winkelstein, J.A., Abramovitz, A.S., and Tomasz, A. (1980). Activation of C3 via the alternative complement pathway results in fixation of C3b to the pneumococcal cell wall. *J Immunol* 124, 2502–2506.

Winkelstein, J.A., and Tomasz, A. (1978). Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J Immunol* 120, 174–178.

Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A.C., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Berger, K., Mitchell, T.J., de los Toyos, J.R., Rosseau, S., Suttorp, N., *et al.* (2006). Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 34, 1947–1954.

Witzenrath, M., Schmeck, B., Doehn, J.M., Tschernig, T., Zahlten, J., Loeffler, J.M., Zemlin, M., Müller, H., Gutbier, B., Schütte, H., *et al.* (2009). Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37, 642–649.

Wizemann, T.M., Heinrichs, J.H., Adamou, J.E., Erwin, A.L., Kunsch, C., Choi, G.H., Barash, S.C., Rosen, C.A., Masure, H.R., Tuomanen, E., *et al.* (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69, 1593–1598.

Wood, J.L.N., Newton, J.R., Chanter, N., and Mumford, J.A. (2005). Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol* 43, 120–126.

Wright, A.E., Morgan, W.P., Colebrook, L.B., and Dogson, R.W. (1914). Observations on prophylactic inoculations against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. *Lancet* 183, 1–10.

Wu, H.Y., Nahm, M.H., Guo, Y., Russell, M.W., and Briles, D.E. (1997). Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases* 175, 839–846.

Wuorimaa, T., Kayhty, H., Leroy, O., and Eskola, J. (2001). Tolerability and immunogenicity of an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine in adults. *Vaccine* 19, 1863–1869.

Xu, Q., Kaur, R., Casey, J.R., Sabharwal, V., Pelton, S., and Pichichero, M.E. (2011). Nontypeable *Streptococcus pneumoniae* as an otopathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69, 200–204.

Xu, Y., Ma, M., Ippolito, G.C., Schroeder, H.W., Jr, Carroll, M.C., and Volanakis, J.E. (2001). Complement activation in factor D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14577–14582.

Yan, H., KuoLee, R., Tram, K., Qiu, H., Zhang, J., Patel, G.B., and Chen, W. (2009). 3',5'-Cyclic diguanylic acid elicits mucosal immunity against bacterial infection. *Biochemical and biophysical research communications* 387, 581–584.

Yokota, S., Okabayashi, T., Yoto, Y., Hori, T., Tsutsumi, H., and Fujii, N. (2010). Fosfomycin suppresses RS-virus-induced *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. *FEMS Microbiol Lett* 310, 84–90.

Yother, J. (2004). Capsules. In *The Pneumococcus*, E.I. Tuomanen, T.J. Mitchell, D.A. Morrison, and B.G. Spratt, eds. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press), pp. 30–48.

Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol* 65, 563–581.

Yuan, Z.Q., Lv, Z.Y., Gan, H.Q., Xian, M., Zhang, K.X., Mai, J.Y., Yu, X.B., and Wu, Z.D. (2011a). Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent *Streptococcus pneumoniae* serotypes in China. *Immunol Res* 51, 108–115.

Yuan, Z.Q., Lv, Z.Y., Gan, H.Q., Xian, M., Zhang, K.X., Mai, J.Y., Yu, X.B., and Wu, Z.D. (2011b). Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent *Streptococcus pneumoniae* serotypes in China. *Immunologic research* 51, 108–115.

Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S.E., and Brown, J.S. (2007). Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 3, e120.

Yuste, J., Botto, M., Paton, J.C., Holden, D.W., and Brown, J.S. (2005). Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol* 175, 1813–1819.

Yuste, J., Fenoll, A., Casal, J., Giménez, M.J., and Aguilar, L. (2002a). Combined effect of specific antibodies (as serotherapy or preimmunization) and amoxicillin doses in treatment of *Streptococcus pneumoniae* sepsis in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 4043–4044.

Yuste, J., Jado, I., Fenoll, A., Aguilar, L., Giménez, M.J., and Casal, J. (2002b). β -Lactam modification of the bacteraemic profile and its relationship with mortality in a pneumococcal mouse sepsis model. *J Antimicrob Chemother* 49, 331–335.

Yuste, J., Khandavilli, S., Ansari, N., Muttardi, K., Ismail, L., Hyams, C., Weiser, J., Mitchell, T., and Brown, J.S. (2010a). The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. *Infect Immun* 78, 283–292.

Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jönsson, G., Hyams, C., Cohen, J.M., Camberlein, E., Sriskandan, S., and Brown, J.S. (2010b). Impaired opsonization with complement and phagocytosis of

- Streptococcus pyogenes* in sera from subjects with inherited C2 deficiency. *Microbes Infect* 12, 626–634.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jönsson, G., Tay, L.-S., Hyams, C., Baxendale, H.E., Goldblatt, F., Botto, M., and Brown, J.S. (2008a). Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun* 76, 3761–3770.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jonsson, G., Tay, L.S., Hyams, C., Baxendale, H.E., Goldblatt, F., Botto, M., and Brown, J.S. (2008b). Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infection and immunity* 76, 3761-3770.
- Zähner, D., and Hakenbeck, R. (2000). The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J Bacteriol* 182, 5919–5921.
- Zhang, J.-R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M., and Tuomanen, E. (2000). The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102, 827–837.
- Zhang, Y., Masi, A.W., Barniak, V., Mountzouros, K., Hostetter, M.K., and 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, 3827–3836.
- Zuluaga, A.F., Salazar, B.E., Rodriguez, C.A., Zapata, A.X., Agudelo, M., and Vesga, O. (2006). Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC infectious diseases* 6, 55.