

Ana María Correa¹
Juan Carlos Sanz²
Carmen de las Cuevas¹
Alba Guiu¹
Diego Domingo¹
Teresa Alarcón¹
Manuel López-Brea¹

Bacteriemia neumocócica en pacientes adultos de un hospital de Madrid: serotipos y sensibilidad antibiótica

¹Hospital Universitario de La Princesa, Servicio de Microbiología, Madrid

²Unidad de Microbiología. Laboratorio Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid

RESUMEN

Introducción. El objetivo de este estudio es describir la distribución de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae*, su sensibilidad antimicrobiana y su relación con las vacunas en cepas de neumococo aisladas en hemocultivo de pacientes adultos.

Métodos. Se estudiaron un total de 67 cepas de *S. pneumoniae*. El serotipado se realizó mediante aglutinación con partículas de látex sensibilizadas y la reacción de Quellung. La concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a penicilina, eritromicina, cefotaxima y levofloxacino se determinó mediante E-test.

Resultados. Los serotipos más prevalentes entre las 67 cepas fueron 22F (11,9%) y 3 (11,9%), seguidos de 7F (7,5%) y 19A (7,5%). Los porcentajes de cepas cubiertas por la vacuna neumocócica 7-valente (VNC7V), vacuna neumocócica 13-valente (VNC13V) y vacuna polisacárida 23-valente (VNP23V) fueron respectivamente de 16, 49 y 82%. Los serotipos 22F y 3 ocasionaron en conjunto 14 de los 48 episodios de neumonía bacteriémica (29,2%) y sólo 2 de los de los 19 episodios (10,5%) de bacteriemia sin neumonía. Según el criterio del CLSI del 2007, 12 cepas (17,9%) fueron no sensibles a penicilina. Once de estas 12 cepas (91,7%) fueron simultáneamente resistentes a eritromicina.

Conclusiones. Los serotipos más comunes fueron 22F, 3, 7F y 19A. Tres de ellos (3, 7F y 19A) son serotipos cubiertos por la VNC13V pero no por la VNC7V. El serotipo 22F es un serotipo emergente no cubierto por la VNC7V. Los porcentajes de no sensibilidad a penicilina y resistencia a eritromicina se encontraron en márgenes comparables a los informados en nuestro país.

Palabras Clave: *Streptococcus pneumoniae*, serotipos, sensibilidad antibiótica

Correspondencia:
Ana María Correa Ruiz
Hospital Universitario de La Princesa. Servicio de
Microbiología.
c/ Diego de León, 62. C. P.: 28006 Madrid
Teléfono: 915202317
E-mail: ana-correa@hotmail.es

Pneumococcal bacteremia in adult patients at a hospital in Madrid: serotypes and susceptibility

ABSTRACT

Introduction. The aim of this study is to describe the distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes, its antimicrobial susceptibility profiles and the relation with vaccines in pneumococcal invasive strains isolated from blood cultures of adult patients.

Methods. All pneumococci isolated (67 strains) from blood cultures were serotyped by latex agglutination (Pneumotest latex) and Quellung reaction (Statens Serum Institut, Denmark). Antimicrobial susceptibility testing to penicillin (PEN), cefotaxime (CT), erythromycin (ERY) and levofloxacin (LEV) was performed by the E-test method (Biomérieux, France).

Results. Among the 67 strains isolated, the most prevalent serotypes were 22F (11.9%) and 3 (11.9%), the second most frequent were 7F (7.5%) and 19A (7.5%). The coverage of the strains by the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine (VNC7V), pneumococcal 13-valent conjugate vaccine (VNC13V) and pneumococcal 23-valent polysaccharide (VNP23V) were 16, 49 and 82%, respectively. Serotypes 22F and 3 were responsible for 14 of the 48 episodes of pneumonia with bacteremia (29.2%) and only 2 of the 19 episodes (10.5%) of bacteremia without pneumonia. According to the 2007 CLSI criteria, 12 strains (17.9%) were non-susceptible to penicillin. Eleven of this 12 strains (91.7%) were resistant to erythromycin, simultaneously.

Conclusions. The most common serotypes were 22F, 3, 7F y 19A. Three of them (3, 7F y 19A) are serotypes that are covered by the new VNC13V but not by VNC7V. Serotype 22F is a serotype emergent that is not covered by the VNC7V. The percentage of non-susceptibility to penicillin and resistance to erythromycin was comparable to the percentage reported in our country.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotypes, antimicrobial susceptibility

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es un coco grampositivo encapsulado con forma ovalada. Las células se agrupan en parejas (diplococos) o en cadenas cortas. Según las características antigénicas de su polisacárido capsular los neumococos se dividen en serotipos. En la actualidad se conocen más de 90 serotipos de neumococo¹.

S. pneumoniae es un patógeno humano causante de un gran número de infecciones de severidad variable (otitis, sinusitis, neumonía, meningitis, septicemia, peritonitis, pericarditis, etc.). Afecta con más frecuencia a ancianos, niños y personas inmunodeprimidas. Desde un punto de vista microbiológico, se considera enfermedad neumocócica invasora (ENI) todos aquellos procesos en los que aísla el microorganismo a partir de muestras clínicas procedentes de fluidos y tejidos habitualmente estériles².

La principal respuesta inmune frente a *S. pneumoniae* es específica para el polisacárido capsular³. Por ello, la protección es en gran medida dependiente de serotipo. La infección neumocócica es en la actualidad una enfermedad inmunoprevenible. El desarrollo de vacunas antineumocócicas se ha basado en dos estrategias: las vacunas polisacáridas y las vacunas conjugadas⁴.

Las vacunas conjugadas son de producción más fácil, resultan relativamente baratas y pueden incluir un número más elevado de serotipos. Su desventaja estriba en que generan una respuesta inmune T-independiente (es decir no otorgan memoria inmunológica y, por tanto, no son eficaces en niños)⁴. La vacuna neumocócica polisacárida 23 valente (VNP23V), que incluye 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, se ha recomendado para personas de edad avanzada⁵.

En las vacunas conjugadas los polisacáridos se unen a una proteína transportadora que hace que la respuesta inmune sea T-dependiente. Por este motivo sí generan memoria inmunológica y pueden ser administradas a niños⁴. Estas vacunas son de producción mucho más difícil (cubren pocos serotipos) y resultan más caras. La vacuna neumocócica conjugada 7 valente (VNC7V), que incluye los serotipos que eran más comunes en los años 90 del siglo pasado (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F), fue aprobada en estados en el año 2000 y se comercializó en Europa en 2001. En la actualidad existen dos nuevas vacunas conjugadas comercializadas en nuestro país. La vacuna neumocócica conjugada 10 valente (VNC10V), que añade a los serotipos cubiertos por la VNC7V los serotipos 1, 5, y 7F, y la vacuna neumocócica conjugada 13 valente (VNC13V) que además contiene los serotipos 3, 6A, y 19A. En la Comunidad de Madrid la VNC7V se introdujo en el calendario sistemático de inmunización infantil en noviembre de 2006 y fue reemplazada por la VNC13V en junio de 2010⁶.

El objetivo de este estudio es describir la distribución de los serotipos, su sensibilidad antimicrobiana y su relación con las vacunas en cepas de neumococo aisladas en hemocultivo de pacientes adultos atendidos en el Hospital de la Princesa de Madrid durante un periodo de dos años.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Hospital de La Princesa de Madrid. Este centro cuenta con 560 camas y atiende personas adultas de un sector de población de 500.000 habitantes.

Se estudiaron un total de 67 cepas de *S. pneumoniae* aisladas en hemocultivo. Estas cepas correspondían a 66 pacientes (un paciente sufrió dos episodios de ENI recurrente separados por un intervalo superior a un mes) atendidos en el Hospital de la Princesa entre agosto de 2007 y julio del 2010.

En cada episodio se recogieron las siguientes variables: sexo, edad, fecha de ingreso y fecha del alta o fallecimiento, tabaquismo, enolismo y datos microbiológicos de cada aislamiento (serotipado y perfil de sensibilidad antibiótica).

La identificación de *S. pneumoniae* se realizó mediante metodología estándar (α -hemólisis en agar-sangre, sensibilidad a optoquina y resultado negativo para la prueba de catalasa). El serotipado se realizó mediante aglutinación con partículas de látex sensibilizadas (Pneumotest latex; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) y la reacción de Quellung (antisueros del Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a penicilina, cefotaxima, eritromicina y levofloxacino se determinó mediante el método de E-test (AB biomérieux, Solna Sweden). La clasificación cualitativa de sensibilidad o resistencia antibiótica se asignó utilizando los puntos de corte para aislamientos no meníngeos del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) de 2007 y 2008^{7,8}.

RESULTADOS

Los serotipos más prevalentes entre las 67 cepas estudiadas fueron 22F (11,9%) y 3 (11,9%), seguidos de 7F (7,5%) y 19A (7,5%). La tabla 1 muestra la distribución de serotipos y su relación con vacunas neumocócicas. Los porcentajes de cepas cubiertas por las VNC7V, VNC13V y VNP23V fueron respectivamente de 16, 49 y 82%.

La edad media de los 66 pacientes estudiados fue 68,3 (rango 67, desviación estándar 16,6). Veintinueve pacientes eran varones y 37 mujeres. Un 71,6% de los episodios de ENI correspondieron a neumonía bacteriémica (21 en hombres y 27 en mujeres) un 25,3% se trataron de bacteriemia sin foco (5 en hombres y 9 en mujeres) y un 3,1% de meningitis con bacteriemia (4 en hombres y 1 en una mujer).

Los serotipos 22F y 3 ocasionaron en conjunto 14 de los 48 episodios de neumonía bacteriémica (29,2%) y sólo 2 de los de los 19 episodios (10,5%) de bacteriemia sin neumonía (episodios de bacteriemia sin foco o meningitis con bacteriemia) ($p < 0,05$, test exacto de Fisher de 2 colas).

Entre los 48 pacientes que sufrieron neumonía, 32 (66,7%) presentaban antecedentes de hábitos tóxicos de tabaquismo y/o consumo habitual de alcohol mientras que sólo 7 de los 19 (38,8%) con bacteriemia sin neumonía referían este tipo de antecedentes ($p < 0,05$, test de chi cuadrado).

Tabla 1 Distribución de serotipos y cobertura vacunal.

Serotipo	Cepas (total)	% Cepas (total)	Vacuna
3	8	11,9	VNC13V, no VNC7V
22F	8	11,9	VNP23V, no vacunas conjugadas
19A	5	7,5	VNC13V, no VNC7V
7F	5	7,5	VNC13V, no VNC7V
1	4	6,0	VNC13V, no VNC7V
8	4	6,0	VNP23V, no vacunas conjugadas
6A	4	6,0	VNC13V, no VNC7V no VNP23V
4	4	6,0	VNC7V
12F	3	4,5	VNP23V, no vacunas conjugadas
14	3	4,5	VNC7V
19F	2	3,0	VNC7V
9N	2	3,0	VNP23V, no vacunas conjugadas
10A	2	3,0	VNP23V, no vacunas conjugadas
16F	2	3,0	No vacunal
21	2	3,0	No vacunal
11A	1	1,5	VNP23V, no vacunas conjugadas
35B	1	1,5	No vacunal
15B	1	1,5	VNP23V, no vacunas conjugadas
18C	1	1,5	VNC7V
15A	1	1,5	No vacunal
6B	1	1,5	VNC7V
23A	1	1,5	No vacunal
17F	1	1,5	VNP23V, no vacunas conjugadas
28	1	1,5	No vacunal
	67	100	

Entre los pacientes incluidos en este estudio, 5 estaban infectados por VIH. Todos ellos padecieron neumonía bacteriémica. Uno de estos pacientes sufrió dos episodios recurrentes causados por distintos serotipos (22F y 35B). La distribución de los serotipos en los episodios de ENI registrados en pacientes VIH positivos fue la siguiente: dos serotipos 22F y los cuatro restantes serotipos 1, 4, 19A y 35B.

Diez de los 66 pacientes (15,2%) fallecieron (ninguno de ellos presentaba antecedentes e infección por el virus del VIH). Entre los pacientes que murieron 5 sufrían neumonía con bacteriemia (en dos pacientes se aisló el serotipo 3, y en el resto los serotipos 11A, 22F y 6B), 3 bacteriemia sin foco (serotipos 19A, 19F y 6A) y 2 meningitis (serotipos 12F y 7F).

Según el criterio del CLSI de 2007 ($>0,06$ mg/L), 12 cepas (17,9%) fueron no sensibles a penicilina (tabla 2). Estas cepas

pertencieron a los serotipos 19A, 14, 19F, 22F, 35B, y 6B (33,3%, 25,0%, 16,7%, 8,3%, 8,3% y 8,3% del total de cepas no sensibles, respectivamente). Al considerar el punto de corte del CLSI de 2008 (>2 mg/L) sólo una cepa (1,5%), perteneciente al serotipo 6B, mostró sensibilidad intermedia a penicilina. Tres cepas (4,5%; serotipos 14, 19A y 6B) presentaron sensibilidad intermedia a cefotaxima. El nivel de resistencia a eritromicina fue del 20,9% (13 cepas) (tabla 2). La distribución de serotipos entre las cepas resistentes a eritromicina fue 19A, 14A, 11A, 16F, 19F, 22F, 35B y 6B (30,8%, 23,1%, 7,7%, 7,7%, 7,7%, 7,7%, 7,7% y 7,7 del total de cepas resistentes, respectivamente). No se detectó ningún aislamiento resistente a levofloxacino. Once de las 12 cepas (91,7%) no sensibles a penicilina según el criterio del CLSI de 2007 fueron simultáneamente resistentes a eritromicina (serotipos, 19A [4 cepas], 14 [3 cepas], y 19F, 22F, 35B y 6B).

Tabla 2 Sensibilidad antibiótica.

	Penicilina CLSI 2007		Penicilina CLSI 2008		Cefotaxima		Eritromicina		Levofloxacino	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S	55	82,1	66	98,5	64	95,5	53	79,1	67	100,0
I	10	14,9	1	1,5	3	4,5	1	1,5	0	0,0
R	2	3,0	0	0,0	0	0,0	13	19,4	0	0,0
CM _I ₅₀ (mg/L)	0,016		0,016		0,023		0,125		0,75	
CM _I ₉₀ (mg/L)	0,75		0,75		0,5		> 256		1,5	

S: sensible, I=intermedio, R=resistente

CM_I₅₀: Concentración mínima inhibitoria para al menos el 50% de los aislamientos

CM_I₉₀: Concentración mínima inhibitoria para al menos el 90% de los aislamientos

DISCUSIÓN

En este estudio, llevado a cabo mayoritariamente en el periodo comprendido tras la introducción de VNC7V en el calendario sistemático de inmunización infantil de la Comunidad de Madrid y antes de su sustitución por la VNC13V, los serotipos cubiertos por la VNC7V supusieron menos de una quinta parte de los aislamientos en pacientes adultos con ENI. Por el contrario, los serotipos cubiertos por la VNC13V agruparon en conjunto casi la mitad de las cepas. En los últimos años y tras la comercialización de la VNC7V se ha detectado en nuestro país una disminución de los serotipos incluidos en esta vacuna acompañada un aumento en la proporción de otros serotipos (mayoritariamente cubiertos por la VNC13V)⁹. El empleo sistemático de la VNC7V ha provocado en otros países una disminución de la incidencia de ENI, no solo en niños sino también en adultos no vacunados¹⁰. Este fenómeno se conoce como inmunidad de grupo o de rebaño (protección que ejercen los individuos inmunizados sobre el resto de la población a dificultar la transmisión). El descenso en números absolutos de la incidencia de ENI se asocia con una disminución de los serotipos cubiertos por la VNC7V y un aumento, en términos relativos (no en número absolutos), de otros serotipos¹⁰. Este incremento en la proporción de aislamientos correspondientes a serotipos no vacunales se denomina fenómeno de reemplazo. En esta serie, los serotipos más comunes fueron 22F, 3, 7F y 19A (estos cuatro serotipos supusieron el 38,8% de todos los aislamientos). Tres de ellos (3, 7F y 19A) son serotipos cubiertos por la nueva VNC13V pero no por la VNC7V. Entre los serotipos emergentes no cubiertos por la VNC7V destacan el 22F^{10, 11}, 19A, 7F¹⁰ y 11¹¹. Los serotipos 7F y 19A⁹ se incrementaron en España como causa de ENI a partir de los años 90 del pasado siglo. El serotipo 22F no ha sido muy común en nuestro medio⁹. Sin embargo, en algunas naciones europeas se ha observado su ascenso tras la introducción de la VNC7V^{10, 11}. Dado que este serotipo no está cubierto por ninguna de las vacunas conjugadas actualmente disponibles, este aumento podría llegar a ser preocupante. El serotipo 3

se ha mantenido constante durante las últimas décadas en nuestro país⁹. En niños, y tras la vacunación con VNC7V este serotipo ha sido menos prevalente que otros cubiertos por la VNC13V pero no por la VNC7V¹². Sin embargo, es muy común en pacientes de edad avanzada en los que se asocia con una elevada letalidad⁶.

A pesar de los logros alcanzados en su prevención, la infección por *S. pneumoniae* continúa representando una importante causa de morbilidad y mortalidad. Se estima que en Estados Unidos ocasiona anualmente 4 millones de episodios de enfermedad, 445.000 hospitalizaciones y 22.000 muertes¹³. El papel de *S. pneumoniae* en la enfermedad invasora depende tanto de su virulencia como de su interacción con el huésped, de forma que las cepas de baja capacidad invasora afecten preferentemente a huéspedes con factores de riesgo¹⁴. Habitualmente se considera que los niños colonizados constituyen un importante factor en la transmisión del neumococo a los adultos^{15, 16}. El serotipo 19A se ha descrito como un colonizador frecuente de la nasofaringe de niños sanos¹⁷. Por el contrario, el porcentaje de niños portadores de los serotipos 3, 22F y 7F es muy bajo en nuestro entorno¹⁷. Este hecho plantea incógnitas sobre el origen de la transmisión de estas cepas en adultos. En el presente estudio se apreció que los serotipos 3 y 22F estaban más asociados con neumonía que otros serotipos. El serotipo 3 se ha descrito clásicamente como de baja capacidad invasora (poca tendencia a pasar de colonizador a invasor)¹⁸. Sin embargo, recientemente se ha observado que tanto el serotipo 3 como el 22F pueden exhibir una elevada capacidad invasora¹⁹.

La incidencia de ENI es superior en las edades extremas de la vida (menores de 2 años y mayores de 65)¹⁶. Existen algunos factores de riesgo para la adquisición de ENI como son abuso de alcohol, exposición a humo de tabaco, insuficiencia cardíaca, infección previa por virus de la gripe, diabetes mellitus, asma, asplenia y estados de inmunodepresión (incluida la infección por VIH)¹⁶. En nuestro estudio la edad media de los casos fue elevada y se observó una clara relación entre neumonía

neumocócica y consumo de tabaco y/o alcohol. La letalidad resultó superior a la observada en el conjunto de la población⁶.

Los porcentajes de no sensibilidad a penicilina y resistencia a eritromicina se encontraron en márgenes comparables a los informados en nuestro país en los últimos años²⁰. La no sensibilidad a penicilina y resistencia a eritromicina se relaciona en buena medida con el serotipo 19A⁹. Este fue el serotipo más frecuente entre las cepas no sensibles a penicilina y simultáneamente resistentes a eritromicina. No se detectó ninguna cepa resistente a levofloxacino. Pese a que la resistencia a levofloxacino en España es baja, en la Comunidad de Madrid se ha informado un porcentaje de resistencia del 3,3%²¹ asociada con la aparición de un clon perteneciente al serotipo 8 que afecta con frecuencia a pacientes con infección por VIH²².

Pese a las limitaciones derivadas del reducido número de cepas estudiadas, los resultados de este estudio señalan que los serotipos más frecuentes entre pacientes adultos con ENI atendidos en nuestro hospital no se corresponden con los principales serotipos no cubiertos por la VNC7V causantes de ENI pediátrica en nuestro medio¹². El serotipo 1, que puede suponer casi una cuarta parte de los casos de ENI pediátrica en Madrid, se detectó en sólo un 6% de los casos en esta serie. Por el contrario los principales serotipos en nuestro estudio (22F y 3) no son tan comunes en niños. En los próximos años, y tras la comercialización de la nueva vacuna VNC13V y su inclusión en el calendario de vacunación infantil de algunas Comunidades Autónomas es muy probable que asistamos a cambios similares a los acontecidos tras la introducción de la VNC7V, con fenómenos de reemplazo, inmunidad de grupo y variaciones en la resistencia antibiótica. La vigilancia de estos eventos, crucial en los grupos de edad sujetos a vacunación, debe hacerse extensiva a toda la población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kuch A, Sadowy E, Skoczy ska A, Hryniewicz W. First report of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D isolates from invasive infections. *Vaccine* 2010; 28: 6406-7.
2. Werno AM, Murdoch DR. Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 926-32.
3. Casal J, Tarragó D. Immunity to *Streptococcus pneumoniae*: Factors affecting production and efficacy. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 219-24.
4. Eskola J. Immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 388-93.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). *Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59: 1102-6.
6. Gutiérrez Rodríguez MA, Varela González A, Ordobás Gavín MA, Martín Martínez F, García Marín N, Ramos Blázquez B, et al. Invasive pneumococcal disease: association between serotype, clinical presentation and lethality. *Vaccine* 2011; 29: 5470-6.
7. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
9. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, et al. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1012-20.
10. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 760-8.
11. Rodenburg GD, de Greeff SC, Jansen AG, de Melker HE, Schouls LM, Hak E, et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 816-23.
12. Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Giangaspro E, Del Castillo F, Hernández-Sampelayo T, et al. Relationship between serotypes, age, and clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Madrid, Spain, after introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine into the vaccination calendar. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 89-94.
13. Huang SS, Johnson KM, Ray GT, Wroe P, Lieu TA, Moore MR, et al. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine* 2011; 29: 3398-412.
14. Sjöström K, Spindler C, Ortvqvist A, Kalin M, Sandgren A, Kühlmann-Berenzon S, et al. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 451-9.
15. De Lencastre H, Tomasz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 (Suppl S2): 75-81.
16. Lynch JP 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 217-25.
17. García-Vera C, Ruiz Andrés MA, Arana Navarro T, Moneo Hernández I, Castillo Laita JA, Macipe Costa R, et al. Serotipos de neumococo en nasofaringe de niños preescolares sanos tras la vacunación antineumocócica conjugada heptavalente. *Med Clin (Barc)* 2011; 137:1-7.
18. Jansen AG, Rodenburg GD, van der Ende A, van Alphen L, Venhoven RH, Spanjaard L, et al. Invasive pneumococcal disease among adults: associations among serotypes, disease characteristics, and outcome. *Clin Infect Dis* 2009; 49: e23-9.
19. Yildirim I, Hanage WP, Lipsitch M, Shea KM, Stevenson A, Finkelstein J, et al. Serotype specific invasive capacity and persistent reduction in invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 2010; 29: 283-8.
20. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 402-10.

21. Rodríguez-Avial I, Ramos B, Ríos E, Cercenado E, Ordobás M, Sanz JC; on behalf of the Madrid Streptococcus pneumoniae Microbiological Group. Clonal Spread of Levofloxacin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Invasive Isolates in Madrid, Spain, 2007 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2469-2471.
22. Sanz JC, Cercenado E, Marín M, Ramos B, Ardanuy C, Rodríguez-Avial I, et al. Multidrug-resistant pneumococci (serotype 8) causing invasive disease in HIV+ patients. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1094-8.