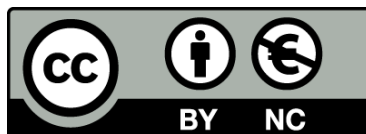




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Impact of molecular methods in the analysis of the invasiveness of *Streptococcus pneumoniae*

Eva del Amo Morán

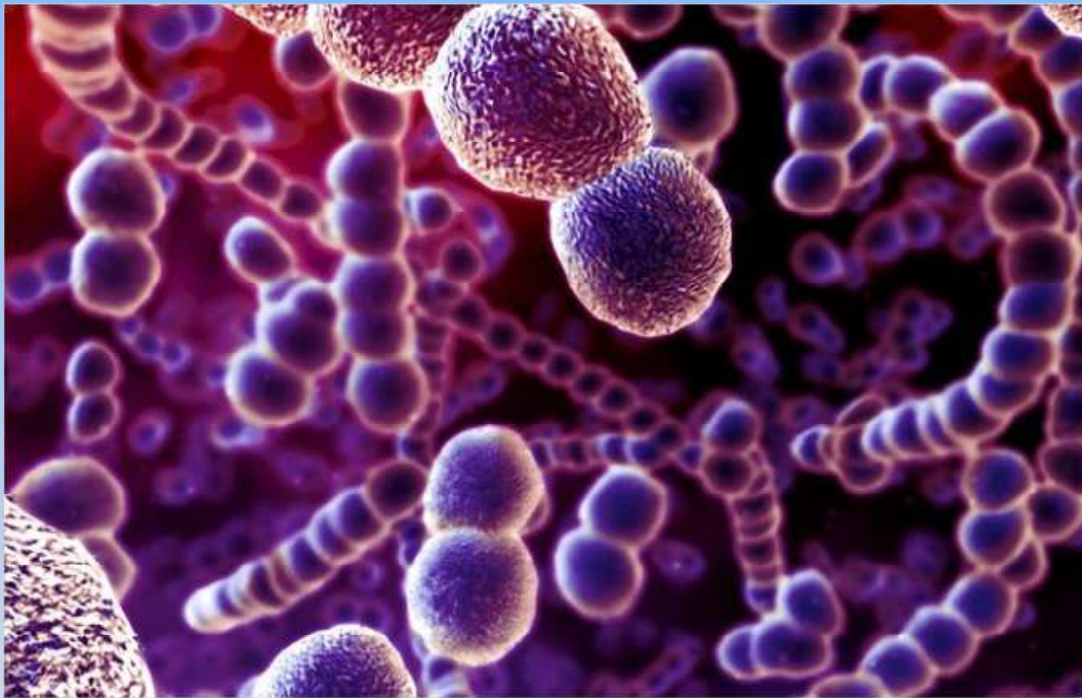


Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License**.

Impact of molecular  
methods in the analysis of  
the invasiveness of  
*Streptococcus pneumoniae*



**Eva del Amo Morán**

Universitat de Barcelona

2016



Doctoral Thesis

**IMPACT OF MOLECULAR METHODS IN THE  
ANALYSIS OF THE INVASIVENESS OF  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

Eva del Amo Morán



Facultat de Medicina

Departament d'Obstetrícia, Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Medicina Física

Programa de Doctorat en Medicina

Tesi Doctoral presentada per Eva del Amo Morán per optar al títol de Doctora per la  
Universitat de Barcelona

Dra Carmen Muñoz-Almagro

Dra. Iolanda Jordan Garcia

Directora

Directora

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Carmen Muñoz-Almagro i de la Dra. Iolanda Jordan Garcia al Departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu.

Barcelona, Abril 2016

This research has been funded by:

Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III

Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR)

Godia Foundation

Sant Joan de Déu Foundation

Health Department of Generalitat de Catalunya

## AGRAÏMENTS

M'agradaria fer un petit agraïment a totes les persones que en un moment o altre, a nivell professional o a nivell personal, i de la manera que han pogut, m'han ajudat en l'elaboració d'aquesta tesis doctoral tant col·laborant en les tasques realitzades com bé oferint-me el seu suport i recolzament:

*Primer de tot, a la Dra. Carmen Muñoz-Almagro per donar-me la oportunitat d'elaborar aquest projecte, per la seva guia durant aquests quatre anys de realització de la tesis i per posar la seva experiència i coneixements al servei d'aquest projecte per aconseguir-ne'n el millor.*

*A la Dra. Iolanda Jordan, per la seva col·laboració, la seva amabilitat, i la seva disponibilitat en tot moment per oferir-me el seu coneixement sempre que ho he necessitat.*

*A tot el Departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu, tant membres actuals com antics, per tots aquests anys compartits en que sempre m'han ofert el seu suport i amistat, consells i experiència, tant en la feina com en l'àmbit personal. I sobretot gràcies pels moments compartits entre esmoçars i tardes de cafés.*

*A la Dra. Raquel Sá-Leão i al grup del laboratori of Molecular Microbiology of Human Pathogens del ITQB (en especial a la Carina Valente i a la Sofia Félix), per l'experiència compartida a Portugal i per fer-me sentir com a casa durant la meva estada.*

*A la Dra. Asunción Fenoll, del Centro de Referencia de Neumococos, del Instituto de Salud Carlos III, pel serotipat de les soques de pneumococs.*

*A la Maite López i a la Roser Arnalte, gestores de projectes de la Fundació Sant Joan de Déu, per la seva disponibilitat constant per resoldre qualsevol dels meus dubtes.*

*A tots els laboratoris participants en el grup d'estudi de vigilància epidemiològica de la malaltia pneumocòccica invasora a Catalunya, al igual que al servei de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya encapsalat per la Dra. Pilar Ciruela.*

*Al servei de pediatria de l'Hospital Sant Joan de Déu, pel seu comprimís i esforç en el reclutament de pacients per als diferents estudis que realitzem al departament.*

*Al Dr. Bonaventura Ruiz i a tot el personal del laboratori de l'Hospital Sant Joan de Déu, per les estones compartides durant aquests anys.*

*Al Departament de Microbiologia de l'Hospital per la seva ajuda, la seva paciència, i per compartir el seu espai de treball sempre que ho he necessitat.*

*A les meves amigues, per la seva infinita paciència durant aquests quatre anys de tesis, per tota l'ajuda prestada, per donar-me sempre la seva opinió i consells en tots els treballs i exposicions que he realitzat, per donar-me ànims sempre que ho he necessitat, i en general gràcies per ser les meves amigues.*

*I per últim i més important, als meus pares sense els quals res del que faig no seria possible. Gràcies per estar sempre al meu costat, per no deixar que m'enfonsi en els moments durs, per donar-me forces quan ho necessito, i sobretot gràcies pel vostre amor incondicional.*

## ABBREVIATIONS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CI	Confidence Interval
<i>cpsA</i>	Capsular gene
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMA	European Medicine Agency
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAF-mPCR	Multiplex PCR with Fragment Analysis and automated Fluorescent capillary electrophoresis
FDR	False Discovery Rate
IC	Invasive Capacity
IDP	Invasive Disease Potential
IPD	Invasive Pneumococcal Disease
<i>lytA</i>	Autolysin
MDR	Multi-Drug Resistant
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MLVA	MultiLocus Variable number of tandem repeats Analysis
mPCR	Multiplex PCR
mPCR/RLB	Multiplex PCR and Reverse line Blot hybridization
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR/ESI-MS	PCR and Electrospray Ionization Mass Spectrometry
PCR-RFLP	PCR and Restriction Fragment Length Polymorphisms
PCV	Pneumococcal Conjugate Vaccine



PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
<i>Ply</i>	Pneumolysin
PPV	Pneumococcal Polysaccharide Vaccine
RT-PCR	Real-Time PCR
SID	Simpson's Index of Diversity
SLV	Single Locus Variant
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
<i>S. pneumoniae</i>	Streptococcus pneumoniae
ST	Sequence Type

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b> Pathogenic route for <i>Streptococcus pneumoniae</i> infection (Data from: Bogaert D et al. 2004) .....	<b>page 2</b>
<b>Figure 2.</b> Pneumococcal virulence factors (Data from: Kadioglu A et al. 2008) ....	<b>page 3</b>
<b>Figure 3.</b> Immune response of the host to PCV (Data from: Pollard AJ et al. 2009) .....	<b>page 6</b>
<b>Figure 4.</b> Mechanism of the herd protection (Data from: <a href="http://www.vaccines.gov/basics/protection/">http://www.vaccines.gov/basics/protection/</a> ).....	<b>page 7</b>
<b>Figure 5.</b> Standard methods for the identification of <i>Streptococcus pneumoniae</i> : a) Gram stain morphology, b) optochin sensibility (left a negative result, right a positive result) and c) latex agglutination (Data from: Werno AM et al. 2008, <a href="http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual">http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual</a> and <a href="http://www.bacteriaiphotos.com/">http://www.bacteriaiphotos.com/</a> ) .....	<b>page 9</b>
<b>Figure 6.</b> Principle of the Polymerase Chain Reaction (Data from: Garibyan L et al. 2013) .....	<b>page 11</b>
<b>Figure 7.</b> Real-Time PCR chemistries (Data from: <a href="https://www.lifetechnologies.com">https://www.lifetechnologies.com</a> ) .....	<b>page 12</b>
<b>Figure 8.</b> Quellung reaction (Data from: Werno AM et al. 2008) .....	<b>page 14</b>
<b>Figure 9.</b> General scheme of PCR-ESI/MS (Data from: <a href="https://www.aacc.org">https://www.aacc.org</a> )....	<b>page 17</b>
<b>Figure 10.</b> The mPCR/RLB principles (Data from: O’Sullivan M et al. 2011) ....	<b>page 18</b>
<b>Figure 11.</b> Steps of the nanofluidic PCR reaction (Data from: <a href="http://www.lifetechnologies.com">http://www.lifetechnologies.com</a> ) .....	<b>page 19</b>

**Figure 12.** Process of the microarray method (Data from: <http://www.biotechspace.site90.com/>).....**page 20**

**Figure 13.** Routes of horizontal gene transfer in bacteria (Data from: Stewart FJ et al. 2013) .....**page 25**