



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Relació entre la malaltia pneumocòccica invasiva i el dèficit genètic de MBL (*mannose-binding lectin*)

Carles Bautista Rodríguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital

**Relació entre la malaltia pneumocòccica invasiva
i el dèficit genètic de *MBL* (*mannose-binding lectin*)**

Carles Bautista Rodríguez

**Relació entre la malaltia pneumocòccica
invasiva i el dèficit genètic de *MBL***

(mannose-binding lectin)

Tesi Doctoral presentada per
Carles Bautista Rodríguez
per optar al títol de Doctor en Medicina
per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Carmen Muñoz Almagro i
el Dr. Cristian Launes Montaña i la tutorització de la Dra. Iolanda
Jordan, a la Unitat de Malalties Infeccioses Pediàtriques, Servei de
Pediatria, i el Departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital
Sant Joan de Déu (Universitat de Barcelona)

Línia de recerca:

*Fisiopatologia malalties fetals i pediàtriques (Departament d'Obstetrícia-Ginecologia,
Pediatria, Radiologia i Anatomia). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona*

Informe Directors de Tesi

Barcelona, setembre de 2017

Els directors de la tesi, Dra. Carmen Muñoz Almagro i Dr. Cristian Launes Montaña

CERTIFIQUEN que la Tesi Doctoral titulada *Relació entre la malaltia pneumocòccica invasiva i el dèficit genètic de MBL (mannose-binding lectin)* presentada per Carles Bautista Rodríguez per a l'obtenció del grau de Doctor en Medicina per la Universitat de Barcelona compleix amb tots els requisits administratius i acadèmics per ser sotmesa a la seva defensa davant de la corresponent comissió i,

CERTIFIQUEN que els articles presentats en aquesta tesi:

Article 1. High prevalence of genetically-determined mannose-binding lectin-deficiency in young children with invasive pneumococcal disease

Article 2. Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants

Pertanyen a una mateixa temàtica, que el doctorand és el primer autor/coautor de les publicacions, que estan publicades en revistes indexades que es troben en el primer quartil de l'àrea de coneixement i que no formen part de cap altra tesi doctoral. Tanmateix, la participació del doctorand ha estat fonamental i decisiva en el disseny, interpretació i anàlisi de les dades i redacció dels treballs presentats.

Dra. Carmen Muñoz Almagro

Dr. Cristian Launes Montaña

El primer article que conforma aquesta tesi ha rebut fons del *Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)* cofinançat per *European Regional Development Fund "A way to achieve Europe"* (FIS, número de projecte PI 10/02058 i PI 13/01729), AGAUR (número d'expedient SGR 00136) i *Fundación Godia*.

El segon article que conforma aquesta tesi ha rebut fons del *Ministerio de Economía y Competitividad (Plan Nacional de I+D+I, SAF2013-46151-R)*; *Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)* cofinançat per *European Regional Development Fund "A way to achieve Europe"* (FIS, número de projecte PI 13/01729) i la *Red Española de Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI, RD12/0015/0018)*.

Les entitats de finançament no han tingut cap paper en el disseny de l'estudi, ni en la recollida i anàlisi de dades, ni en les decisions sobre la seva publicació.

Més enllà de temors i recances s'obren sempre blaus horitzons
(Miquel Martí i Pol)

AGRAÏMENTS

A la Marta molt especialment per ser energia i ferm suport, a qui estimo bojament.

A en Marcel per ser l'origen inesgotable d'alegria.

A la Berta per arrencar somriures abans de ser-hi.

Als meus pares que han treballat fort per fer-me el que sóc.

A la meva germana Sílvia que m'acompanya des de ben petit.

A la meva família d'Olot i Palacios que no dubten mai en donar un cop de mà.

A la Dra. Carmen Muñoz-Almagro, directora de la meva tesi i locomotora incansable.

Moltes gràcies per la teva força i empena!

Al Dr. Cristina Launes, director de la meva tesi i referent per les coses petites i grans.

Al Servei de Pediatria de l'hospital, molt especialment

al Dr. Juanjo Garcia i la Dra. Mariona Fernández de Sevilla,

que van ensenyar-me Pediatria i descobrir les malalties infeccioses.

Al Departament de Microbiologia Mol·lecular.

A la Unitat de Cures Intensives Pediàtriques per la seva implicació i en especial

a la Dra. Iolanda Jordan per la seva disponibilitat incondicional.

Al Servei de Neonatologia, on hi ha un gran equip i en especial

al Dr. Xavi Rodríguez-Fanjul per ser un impulsor imparable i un amic.

Al Servei de Cardiologia que és la meva casa actual, en especial

al Dr. Fredy Prada per la seva reflexió sincera diària i

a l'Isaac Moll per mostrar-me que hi ha més d'una perspectiva i dir sempre la veritat.

A tots els meus co-Rs que hem fet aquest camí pediàtric junts

i en especial a la Cristina amb qui va començar aquesta aventura.

ÍNDEX

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1.1. Generalitats..... | 3 |
| 1.1.1. Colonització de la via aèria | 4 |
| 1.2. Factors microbiològics..... | 5 |
| 1.2.1 Característiques genètiques i factors de virulència de Streptococcus pneumoniae..... | 5 |
| 1.2.2 Polisacàrid capsular, serotips i invasivitat | 9 |
| 1.3. Factors de l'hoste | 10 |
| 1.3.1 Mecanismes de reconeixement de l'hoste | 11 |
| 1.3.2 Interacció entre el sistema immunològic de l'hoste i el pneumococ..... | 12 |
| 1.3.3 Factors de risc per a desenvolupar malaltia pneumocòccica invasiva..... | 14 |
| 1.4. Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva | 16 |
| 1.4.1 Càrrega de la malaltia pneumocòccica invasiva | 16 |
| 1.4.2 Impacte global de la vacunació infantil..... | 17 |
| 1.4.2.1 Epidemiologia i impacte de la vacunació als Estats Units..... | 18 |
| 1.4.2.2 Epidemiologia i impacte de la vacunació a Europa | 20 |
| 1.4.2.3 Epidemiologia i impacte de la vacunació a Espanya i Catalunya | 21 |
| 1.5. Clínica | 24 |
| 1.6. Diagnòstic | 26 |
| 1.7. Mannose-binding lectin (MBL)..... | 29 |
| 1.7.1 Generalitats..... | 29 |
| 1.7.2 Gen MBL2 i polimorfismes..... | 30 |
| 1.7.3 Polimorfismes de MBL2 i nivells de MBL..... | 31 |
| 1.7.4. Impacte clínic dels nivells de MBL..... | 32 |
| 2. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS..... | 35 |

| | |
|---|------------|
| 3. OBJECTIUS | 41 |
| 4. RESULTATS | 47 |
| Primer article: High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in Young children with invasive pneumococcal disease | 51 |
| Resum del primer article:..... | 63 |
| Segon article: Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants | 69 |
| Resum del segon article:..... | 81 |
| 5. DISCUSSIÓ | 85 |
| 6. CONCLUSIONS | 101 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 107 |
| 8. ABREVIATURES | 143 |

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Generalitats

L'*Streptococcus pneumoniae* (pneumococ) és una bactèria gram-positiva, alfa-hemolítica, catalasa negativa i és un patogen humà obligat. El nínxol ecològic del pneumococ és la nasofaringe humana des d'on pot causar malaltia per contigüitat (otitis, sinusitis o infeccions del tracte respiratori superior) o malaltia invasiva de zones normalment estèrils tant en pacients immunocompetents com immunodeprimits. La bacterièmia per pneumococ pot ocórrer en el context de pneumònia o sense que aquesta estigui present. La disseminació del pneumococ pel torrent circulatori pot provocar, a més a més, l'aparició de complicacions secundàries tals com artritis, meningitis o endocarditis.

El pneumococ és una causa molt freqüent a nivell mundial de pneumònia, meningitis i otitis mitja i s'associa a una morbimortalitat important. S'estima que provoca la mort de gairebé mig milió de nens cada any arreu del món (1).

En els últims anys s'han publicat diversos estudis que han intentat determinar diversos aspectes de la malaltia pneumocòccica tals com factors de risc per desenvolupar la infecció, patogènesi de la malaltia, valoració de la gravetat, impacte de les resistències antibiòtiques i adequació dels tractaments antibiòtics (2). No obstant, encara persisteixen àrees de controvèrsia en relació a aquest tipus d'infeccions. Més recentment, també s'ha avançat en noves línies de tractament basades en genòmica comparativa i mecanismes de senyalització del sistema immunològic innat i adquirit (2–6). La principal àrea d'interès actualment es focalitza en la interacció inicial entre

l'hoste i el patogen quan aquest arriba a la via aèria i els mecanismes que fan que aquest envaeixi el torrent circulatori o el tracte respiratori inferior.

1.1.1. Colonització de la via aèria

Tal com s'ha comentat anteriorment, l'*Streptococcus pneumoniae* és un colonitzador habitual de la nasofaringe. S'estima que la majoria de nens seran colonitzats pel pneumococ a nivell nasofaringe almenys en una ocasió durant els seus dos primers anys de vida. La taxa i duració de colonització està influenciada per l'edat, la raça, l'exposició al fum del tabac i l'assistència a guarderies. En els menors de 5 anys, les taxes de colonització poden arribar al 75% i disminueixen amb l'edat i es situen en el 25% en els adolescents i al voltant del 5% en els adults (7,8). Habitualment els individus només solen estar colonitzats per un únic serotip de pneumococ tot i que s'ha descrit la colonització múltiple (9). La soca de pneumococ pot colonitzar la via respiratòria sense provocar cap altre efecte i la duració de la colonització és generalment específica del serotip (10).

La colonització és el primer pas cap a la invasió de les mucoses de la nasofaringe. Els factors que determinen la possibilitat de desenvolupar MPI són el resultat d'una complexa interacció entre factors de virulència propis del pneumococ i factors immunitaris propis de l'hoste (2). En referència als factors de virulència del pneumococ, el polisacàrid capsular (que defineix el serotip) es considera el principal factor de virulència ja que pot inhibir l'activació del complement i la fagocitosi provocant així la invasió dels teixits i la bacterièmia (5,10,11). Els components de la paret cel·lular i els pili de les diverses soques de pneumococs també són factors de

virulència importants que poden afavorir la invasió. Per últim, s'han descrit clons amb diferent capacitat patogènica dins del mateix grup de serotip.

1.2. Factors microbiològics

1.2.1 Característiques genètiques i factors de virulència de *Streptococcus pneumoniae*

El genoma del pneumococ inclou entre 2 i 2.1 milions de parells de bases segons la virulència de la soca. Es tracta d'un ADN circular que s'acompanya de petits plasmidis. El contingut de guanina-citosina en el ADN de *S.pneumoniae* es situa en el 39.7% i és menor que el que existeix en altres grups de bacteries patògenes.

El genoma conté un grup central de 1553 gens que són essencials per a la viabilitat del patogen(11–13). A més a més, existeixen 154 gens addicionals que contribueixen a la virulència del patogen. *S.pneumoniae* conté un elevat nombre de seqüències d'inserció que pot arribar al 5% de tot el genoma i que juguen un paper molt important en la resistència a antibiòtics.

S.pneumoniae és la bactèria coneguda que expressa un major nombre de canals i proteïnes transportadores. Existeixen transportadors específics acoblats a ATP que poden transportar carboni, aminoàcids i enzims, adquirir nutrients i generar mecanismes de resistència a antibiòtics(13) . El pneumococ destina gran part del seu material genètic a la síntesi del polisacàrid capsular que es considera el factor de virulència més important d'aquest organisme (5). A més, el pneumococ és capaç de regular la quantitat de proteïnes i antígens de superfície presents a la seva càpsula durant les fases de colonització i invasió. Generalment, les càpsules contenen pocs

antígens i proteïnes en les fases de colonització i en canvi augmenten la quantitat d'aquestes en les fases d'invasió per així oferir resistència a la opsonofagocitosi mediada per complement (2,5).

El pneumococ incrusta els gens que defineixen la seva virulència en petites seqüències ben definides dins el genoma que es coneixen com a zones de diversitat. La presència completa o incompleta d'aquestes regions modifiquen la virulència entre soques, fins i tot dins d'un mateix serotip (5,14). El pneumococ posseeix, a més a més, sistemes de senyalització mediat per quinases que poden reconèixer determinades situacions ambientals (tals com densitat cel·lular, disponibilitat de substrats,...) que li permeten modular la síntesi proteica. Així es poden adaptar i sintetitzar pèptids bactericides (15), formar biofilm (16) o augmentar l'expressió de gens que augmenten la seva virulència (5,16). La virulència del pneumococ s'ha adquirit a través de transmissió horitzontal a partir d'altres patògens que els ha permès augmentar la seva invasivitat i adquirir resistència a determinats antibiòtics.

El pneumococ posseeix un gran nombre de factors de virulència que es resumeixen a la Taula 1.

| Factor de virulència | Mecanisme d'acció |
|--|--|
| Polisacàrid capsular (5,6) | Evita mecanismes de recanvi de la mucosa, antifagocitosi, inhibeix la unió de complement i immunoglobulines als receptors de l'hoste |
| Pneumolisina (17,18) | Citolític, lligand de TLR4, indueix ciliostasi, altera mecanismes de neteja de l'arbre respiratori, activa el complement, citoquina, producció de quimioquines |
| Proteïna de superfície pneumocòccica A (19) | Inhibeix la unió de C3b al factor B, unió a membranes epitelials |

| | |
|--|---|
| Proteïna de superfície pneumocòccica C (20) | Unió a factor H i bloqueig de C3b, unió al receptor de la immunoglobulina polimèrica humana durant la invasió |
| Polisacàrid de la paret cel·lular (5) | Activa complement, pro-inflamació |
| Antigen de superfície tipus A (5,11) | Activa l'adquisició de Zn i Mn, protegeix de l'estrès oxidatiu |
| Àcid lipoteicoic (21) | Unió a PAFR, lligand TLR2, proinflamatori |
| Autolisina (5) | Allibera peptidoglicà, àcid teicoic, pneumolisina |
| Hialuronidasa (22) | Degradació proteica a la matriu extracel·lular |
| Enolasa (5) | Unió a fibronectina en teixits de l'hoste |
| Sortasa A (23) | Unió de proteïnes de superfície a la paret cel·lular |
| Pili (24) | Inhibeix fagocitosi, promoció de la invasió |
| Adhesió i virulència de pneumococ (25) | Unió a plasminogen en els teixits de l'hoste |
| Mecanismes d'adquisició de Fe (5) | Promoció creixement bacterià i virulència |
| Bacteriocina (5) | Inhibeix mecanismes de competició entre bacteries, citotoxicitat |
| Neuraminidasa (22) | Contribueix a l'adherència, desaparició d'àcid siàlic en glicopèptids de l'hoste |
| Biofilm i competència (16) | Potencia mecanismes d'adherència |
| Proteasa IgA (5) | Degrada IgA1 humana |

TLR, toll-like receptor; C3b, complement component 3b; PAFR, platelet-activating factor receptor.

Taula 1. Factors de virulència de *Streptococcus pneumoniae*.

L'expressió dels factors de virulència s'ha de realitzar de forma coordinada per garantir la invasió dels teixits. L'expressió d'aquests factors defineix el fenotip de malaltia pneumocòccica invasiva. Els factors de virulència més importants inclouen les

propietats antifagocitosis i adherència del polisacàrid capsular, altres factors d'adherència, els gens que determinen la invasió, el ferro i la resta de transportadors de metalls, la protecció a l'estrès oxidatiu, els mecanismes d'evasió dels sistemes de defensa de l'hoste, la producció de pneumolisina i bacteriocina i la formació de biofilm (5,18–25).

La pneumolisina és una exotoxina pneumocòccica que provoca la lisi de les cèl·lules de l'hoste. A més a més, també inhibeix el moviment ciliar, activa les cèl·lules T CD4+, altera els mecanismes d'acció de les cèl·lules fagocítiques presents a l'arbre respiratori, indueix la secreció de quimoquines i citoquines, estimula la fixació del complement i activa la inflamació (5,17,18).

Els factors de virulència estan il·lustrats a la Figura 1.

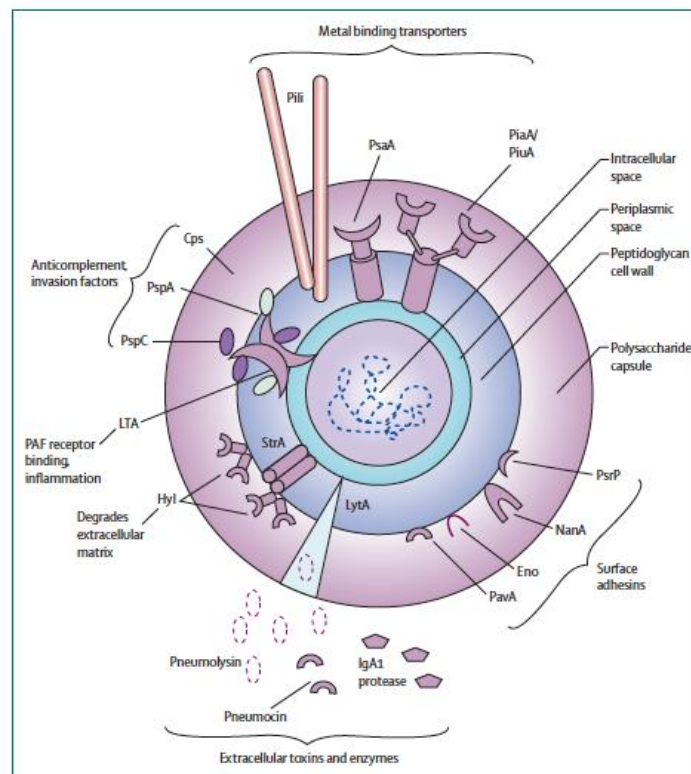


Figura 1. Factors de virulència del pneumococ.

Il·lustració extreta de la revista *Nature* (5)

1.2.2 Polisacàrid capsular, serotips i invasivitat

L'antigen capsular del pneumococ és el factor de virulència més important i permet la colonització, invasió i disseminació des del tracte respiratori. Evita el recanvi mecànic que es produeix a la via respiratòria mitjançant la secreció de moc i permet l'arribada del pneumococ a la superfície epitelial. També inhibeix l'activació del complement i la unió d'immunoglobulines a la superfície de la bactèria. A més inhibeix l'autòlisi i redueix l'exposició de la bactèria als antibiòtics (2,5).

Els polisacàrids capsulars determinen el serotip de *S. pneumoniae* i són, tal i com s'ha comentat, el principal factor de virulència. Existeixen més de 95 tipus capsulars (serotips) ben diferenciats, però no tots tenen la mateixa capacitat per envair i provocar malaltia (6). Es considera que alguns serotips de *S. pneumoniae* tenen un baix potencial per provocar malaltia invasiva i sovint s'aïllen en pacients portadors. Aquests serotips són més prevalents en nens menors de 2 anys, gent gran i pacients amb comorbiditats i són considerats "serotips oportunistes" (26,27). Per altra banda, existeixen també serotips amb un elevat potencial per causar malaltia invasiva i que rarament es detecten en pacients portadors. Aquests serotips sovint causen malaltia invasiva en nens més grans i adults sense comorbiditats (28,29). Curiosament, els serotips amb alt potencial invasiu, tals com el serotip 1, 5 o 7F, s'han associat a patologia amb un curs clínic més benigne i taxes de mortalitat menors que els serotips oportunistes (30,31). Els serotips amb baix potencial invasiu s'han relacionat amb taxes de mortalitat altes i formes de presentació clínica més greus, tals com sèpsia i meningitis (32). Els serotips es classifiquen segons els estudi de Brueggemann (28) i Sleeman (29) basats en tècniques de cultius: 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 18C i 19A es

consideren serotips d'alt potencial invasiu mentre que la resta són considerats de baix potencial invasiu o serotips oportunistes. L'any 2014, la Dra. del Amo et al (33,34) va afegir el serotip 3 a la llista després de realitzar el serotipatge directe (sense cultiu) utilitzant tècniques de microbiologia molecular. Aquest grup de serotips d'alt potencial invasiu són els que generalment estan inclosos en les vacunes antipneumocòcciques (PCV13 i PPSV23).

1.3. Factors de l'hoste

S.pneumoniae colonitza com a comensal el tracte respiratori superior i coexisteix amb altres microorganismes en l'epiteli respiratori. Després de la colonització per un serotip concret de pneumococ, aquest secreta quimiotoxines que eliminen qualsevol altre serotip de pneumococ prèviament present a la via respiratòria. L'estat de portador manté la soca en les poblacions humanes i genera una reacció immunològica adquirida per cèl·lules B que protegeix de la reinfecció.

Tal com s'ha comentat prèviament, existeix un grup de pneumococs amb alta capacitat invasiva i un altre grup que desenvolupa una colonització persistent però amb baixa capacitat per la invasió dels teixits. Les soques altament invasives tenen capacitat per provocar malaltia ràpidament després de la infecció i es transmeten eficientment persona-persona a través de la tos. Les soques amb baixa capacitat invasiva utilitzen adhesines de superfície, estratègies d'evasió immunològica i mecanismes de defensa tals com proteases IgA1 i inhibidors de pèptids antibacterians per romandre com a portadors en la nasofaringe (5). Les soques amb baixa capacitat invasiva es transmeten persona-persona amb menys eficiència però la possibilitat de transmissió s'allarga més

en el temps.

El pneumococ es transmet principalment mitjançant contacte directe amb secrecions contaminades entre membres d'una mateixa família i nens que estiguin colonitzats. De forma general, els pneumococ no es consideren gèrmens altament contagiosos però s'han descrit determinats serotips (ex. serotip 5) amb alta capacitat pel contagi entre persones (35).

1.3.1 Mecanismes de reconeixement de l'hoste

Els receptors de reconeixement de patrons són components clau del sistema immunològic innat. Aquests tipus de receptors reconeixen components expressats pels patògens que són reconeguts com a patrons moleculars associats a microorganismes patògens. Aquest grup de receptors contribueix a iniciar una resposta immunològica innata efectiva contra el pneumococ (36,37).

El pneumococ utilitza el receptor pel factor activador de plaquetes de l'hoste per creuar des del teixit pulmonar cap al torrent circulatori. El pneumococ realitza aquest procés expressant fosforilcolina, que és reconeguda per aquest receptor i inicia el procés de fagocitosi (38). Els *Toll-like receptors* (TLR) també tenen un paper important com a iniciadors de la resposta immunològica innata ja que poden detectar un gran nombre de patògens en les superfícies cel·lulars o en els lisosomes (36,37). TLR2 es considera el receptor de reconeixement més important de patògens gram-positius (a través de peptidoglicà, àcid lipoteicoic o lipopèptids) però el seu paper en el cas del pneumococ és encara controvertit. TLR2 és capaç de reconèixer diversos components

de la paret cel·lular de *S.pneumoniae* (39) però també s'ha publicat que TLR4 o TLR9 tenen un paper molt important en la resposta inflamatòria com a conseqüència del reconeixement de pneumolisina (40). Els elements intracel·lulars associats als TLR també són molt importants en la defensa del pneumococ, tals com el dèficit de *MyD88*, una proteïna associada als TLR que activa les interleuquines 1 i 18. Els nens deficitaris en *MyD88* tenen també major risc de malaltia invasiva pneumocòccica (41,42).

1.3.2 Interacció entre el sistema immunològic de l'hoste i el pneumococ

Existeixen diversos factors immunitaris de l'hoste que juguen un paper important com a primera barrera defensiva davant les infeccions. El sistema immune innat es troba permanentment activat per tal de mantenir la integritat de l'organisme. Existeixen diversos components del sistema immune innat que treballen conjuntament com a primera línia defensiva contra la invasió de patògens i ajuden en la curació de les ferides (43), el remodelatge de teixits i l'angiogènesi (44,45) i la neteja de les cèl·lules apoptòtiques i necròtiques (46). El sistema immunològic innat està conformat per les cèl·lules fagocítiques i *natural killer* (NK), la producció natural d'anticossos, les citocines i altres factors solubles i el sistema del complement.

La resposta immunitària innata és extremadament important durant la primera infància ja que la resposta adaptativa encara es troba en procés de desenvolupament i maduració i la creació d'anticossos sol ser reduïda i de curta duració (47).

Les cèl·lules epitelials de l'arbre respiratori són responsables de dos mecanismes de

defensa. En primer lloc faciliten l'expulsió de patògens mitjançant l'aparell mucociliar. En segon lloc, també participen i responen de forma activa davant la detecció de patògens. Les cèl·lules epitelials secreten diverses citoquines, quimioquines i pèptids antimicrobials (lisozimes, defensines, catelicidines) que contribueixen a la resposta immunològica innata contra el pneumococ (48). El reconeixement del pneumococ per part de les cèl·lules del sistema immunològic presents a l'arbre respiratori desencadena la secreció d'un gran nombre de citoquines. Algunes d'aquestes citoquines tenen un paper importantíssim en la defensa immunològica innata contra la infecció pneumocòccica. Per exemple, el defecte de factor de necrosi tumoral α (TNF α) o d'interleuquina 1 afavoreix el creixement i disseminació del pneumococ (49,50). Els macròfags alveolars són la primera línia defensiva fagocítica de l'aparell respiratori i poden fagocitar i destruir un nombre baix de pneumococs (51). Quan les vies respiratòries baixes son envaïdes per un nombre elevat de pneumococs s'activen mecanismes de reclutament de neutròfils que inflamen el pulmó i alhora actuen com a cèl·lules fagocitàries. Ambdós grups cel·lulars s'encarreguen d'evitar la invasió del torrent circulatori per part del pneumococ (51).

La detecció i destrucció del pneumococ del torrent circulatori depèn de l'opsonització per part dels components del complement i la subseqüent fagocitosi per part de les cèl·lules mieloides (2). Qualsevol alteració en la via del complement altera de forma molt marcada la capacitat de resistència a la infecció pneumocòccica (52). La via clàssica del complement es considera el mecanisme més potent i eficaç contra el pneumococ (53).

1.3.3 Factors de risc per a desenvolupar malaltia pneumocòccica invasiva

Els grups de major risc per desenvolupar MPI són els majors de 65 anys, els infants i les persones amb patologia basal que implica una immunosupressió congènita o adquirida. No obstant, la major incidència de MPI ocorre especialment en els menors de 2 anys (54–56). Aquest grup és especialment susceptible a les infeccions a conseqüència d'un sistema immunològic immadur, les exposicions freqüents i la colonització per *S.pneumoniae*.

L'extensió del pneumococ cap al torrent sanguini i altres líquids estèrils del cos humà també està influenciada per la presència de múltiples factors que es poden categoritzar en factors de risc altament associats a MPI, factors de risc probables i factors de risc possibles (Taula 2) (57,58).

Factors de risc altament associats a MPI (57,58)

- <2 anys o > 65 anys
- Asplènia o hiposplènia
- Alcoholisme
- Diabetis mellitus
- Antecedent d'infecció per *influenza*
- Defectes de la immunitat humoral (complement o immunoglobulines)
- Infecció per VIH
- Colonització recent per soca virulent

Factors de risc probablement associats a MPI

- Polimorfismes genètics (ex. Complement, *MBL*, *IRAK-4*, *MyD88*)(59–61)

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pobresa, aglomeracions urbanes, baix índex de vacunació antipneumocòccica (62) • Tabaquisme (63,64) • Malaltia cardíaca crònica (57) • Malaltia pulmonar crònica (64,65) • Malaltia hepàtica greu (65,66) • Funció mucociliar alterada (66) |
| <p>Factors de risc possiblement associats a MPI</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exposició recent a antibiòtics (67) • Defectes de la immunitat cel·lular o dels neutròfils (68,69) • Reflex tussigen disminuït, pneumònia aspirativa (70,71) • Ús d'inhibidors de la bomba de protons (72) • Assistència a guarderies (73) |

MBL, mannose-binding lectin; IRAK, interleukin 1 receptor associated kinase, MyD88, myeloid differentiation primary response factor 88 adaptor like

Taula 2. Factors de risc per malaltia pneumocòccica invasiva

D'acord amb l'Acadèmia Americana de Pediatria, els principals factors de risc per MPI consisteixen en l'existència de patologia mèdica crònica (immunodeficiències humorals congènites o adquirides, infecció pel VIH, respostes anòmales del sistema immunològic innat, alteració de les funcions de la melsa, diabetis mellitus, implants coclears, fístula de líquid cefaloraquídi malalties cròniques cardíques, pulmonars, hepàtiques o renals) i determinats factors demogràfics (major risc segons l'edat, sexe masculí, raça negra o nadius d'Alaska) (57,58). El risc de MPI també s'ha relacionat amb la presència d'infeccions respiratòries virals, especialment pel virus de la grip. Les infeccions virals augmenten l'expressió en la superfície de les cèl·lules epitelials de l'aparell respiratori

de receptors de pneumococ que poden facilitar la invasió (74,75). La pobresa, les aglomeracions poblacionals, l'assistència a guarderies o el tabaquisme són factors que s'han associat d'una manera probable o possible al risc de MPI però amb pocs estudis publicats a la literatura (62–64,67,76,77).

1.4. Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva

1.4.1 Càrrega de la malaltia pneumocòccica invasiva

La Malaltia Pneumocòccica Invasiva (MPI) es defineix com la infecció per *Streptococcus pneumoniae* de qualsevol localització del cos habitualment estèril. Tal com s'ha comentat anteriorment, es tracta d'un seriós problema de salut que afecta nens i adults. Des del punt de vista pediàtric, es tracta d'una de les principals causes d'infecció greu amb elevada morbimortalitat que afecta als nounats i als infants. La major incidència de MPI ha tingut lloc durant els primers anys de vida amb un pic d'incidència entre els 6 i 11 mesos d'edat (78). La incidència de MPI és especialment elevada en nens menors de 2 anys i pot arribar a xifres superiors a 80-100 casos/100.000 habitants/any (79). En la majoria d'estudis publicats la MPI és més prevalent en nens que en nenes. Només el 2.3% dels pacients que sobreviuen un primer episodi de MPI tindran episodis recurrents de MPI. El major risc de recurrència s'ha descrit en pacients infectats de VIH i en nens menors de 5 anys amb infecció crònica (80).

Un estudi realitzat l'any 2000 va estimar que hi havia més de 14 milions de casos de MPI en nens menors de 5 anys amb una taxa de mortalitat al voltant del 5% i més d'un

milió de morts infantils anualment arreu del món (79). Els 10 països amb major nombre i proporció de casos de MPI es troben a l'Àfrica i l'Àsia i corresponen al 66% de tots els casos de malaltia en tot el món i al 61% del total de morts produïdes per *S. pneumoniae* (79).

Amb la introducció de les vacunes pneumocòcciques conjugades aquestes xifres es van reduir però el pneumococ continua provocant la mort de gairebé mig milió de nens cada any (1).

1.4.2 Impacte global de la vacunació infantil

Tal i com s'ha comentat en el punt anterior, des de la introducció de la vacuna PCV7 la incidència de MPI (meningitis pneumocòccica, pneumònia i bacterièmia) i de colonització nasofaríngia per serotips vacunals ha disminuït dràsticament a tots els grups d'edat, inclosos els pacients immunodeprimits i la gent gran (1,79,81). La introducció de PCV7 fou especialment beneficiosa en aquells individus vacunats (protecció directa) però també es va observar un efecte protector en individus que no havien rebut la vacuna (protecció indirecta). La disminució de MPI en els adults fou molt considerable a causa de l'efecte de protecció indirecta que ofereix la vacuna a adults i nens grans que conviuen amb nens petits vacunats (82). Aquest fet s'explica perquè els individus vacunats tenen protecció davant la colonització i deixen de ser portadors i disseminar agents infecciosos. Així disminueix la taxa de colonització i la taxa d'infecció en la població general (83).

A partir de la introducció de la PCV7 es va observar que aquesta era altament eficaç en

la prevenció de la malaltia produïda pels serotips inclosos però a la vegada es va observar un increment a nivell global de malaltia pneumocòccica causada per serotips no vacunals (fenomen conegut com reemplaçament de serotips) (84,85). El reemplaçament de serotips és conseqüència de l'eradicació de soques de pneumococ incloses en les vacunes que es troben colonitzant la nasofaringe. A conseqüència de la desaparició d'aquestes soques del seu nínxol ecològic habitual, la resta de serotips adquireixen un avantatge i la seva prevalença com a colonitzadors augmenta així com la possibilitat que puguin causar malaltia (86).

1.4.2.1 Epidemiologia i impacte de la vacunació als Estats Units

La incidència de MPI als Estats Units abans de la comercialització de PCV7 era aproximadament 12.5 casos per cada 100.000 persones/any amb una incidència major entre els menors de 2 anys (145 casos/100.000/any) i els majors de 65 anys (32 casos/100.000/any). Els serotips de pneumococs aïllats de forma més freqüent en els menors de 2 anys foren 14, 23F, 19F, 6B, 6A, 9V, 18C, 4 i 19A (87). L'impacte de la vacunació amb PCV7 fou molt important en tots els grups d'edat, però especialment en els menors de 2 anys on la incidència es va reduir un 69% fins als 59 casos/100.000/any. La introducció de la vacunació PCV7 en l'edat pediàtrica va provocar també la reducció de la incidència de MPI i mortalitat associada en els adults i vells, demostrant així els beneficis de la vacunació en la salut immunològica de la població. No obstant, durant el mateix període, les taxes de MPI causada per serotips no vacunals es va incrementar de 16.3 a 19.9 casos/100.000/any en nens menors de 5

anys. La MPI causada per serotips no vacunals abans de la introducció de la PCV7 representava el 17% del total de casos en comparació al 88% després de la introducció de la vacuna. Els principals serotips no vacunals causants de MPI foren 3, 7F, 19A que englobaven el 95% de casos de MPI (78). Amb la introducció de PCV13 s'està observant un descens global del 64% en la incidència de MPI i especialment d'aquella causada per serotips vacunals de PCV13, on el descens fou del 93%. En tots els grups d'edat, els canvis en la incidència foren causats principalment per la disminució de MPI causada per serotips 19A i 7F. Els principals serotips causants de MPI en els menors de 5 anys foren 22F (11%), 33F (10%), 38 (9%) i 35B (8%). No es va identificar un augment significatiu de la incidència de MPI causada per serotips no vacunals en els menors de 5 anys (88,89).

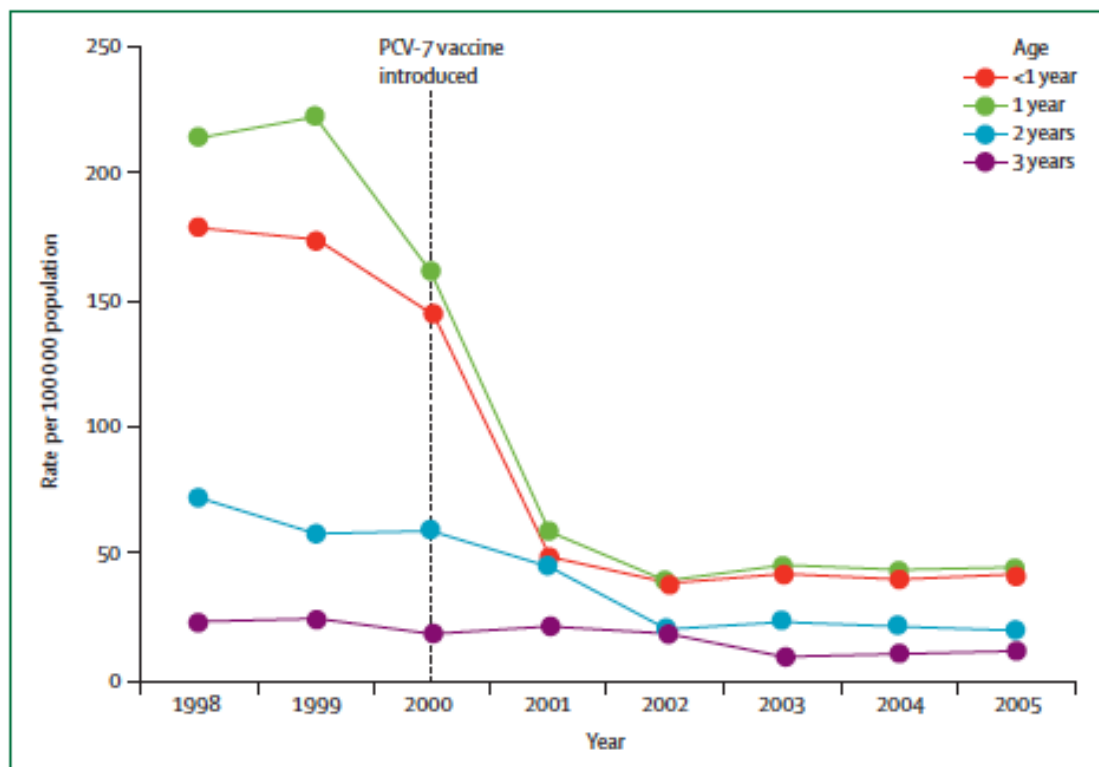


Figura 2. Incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva en nens als EEUU abans i després de la introducció de la vacunació antipneumocòccica 7-valent. Informació extreta de l'informe del *Center for Disease Control and Prevention* de 2010 (78)

1.4.2.2 Epidemiologia i impacte de la vacunació a Europa

La introducció de la vacunació conjugada antipneumocòccica als països europeus es va produir en diferents espais de temps, diversos calendaris vacunals i diversos grups diana (90). La introducció de PCV7 en els calendaris de vacunació infantils va provocar una disminució significativa de MPI causada per serotips vacunals però també va provocar un augment MPI causada per serotips no vacunals tals com 19A, 1 i 7F (91). Aquest fet s'explica parcialment pel fenomen de recanvi comentat anteriorment i per la introducció de clons virulents de serotips no inclosos en la vacuna 7-valent (92–95). L'any 2009 es va aprovar la comercialització a Europa de PCV10 i PCV13. L'impacte d'aquestes vacunes està essent estudiat encara actualment. Els nivells de vacunació han arribat a ser superiors al 75 % en determinats països europeus (República Txeca, França, Irlanda, Noruega, Suècia o Escòcia al Regne Unit) (96). De forma global, la incidència de MPI en els nens menors de 5 anys ha disminuït arreu d'Europa després de la introducció de PCV13 en comparació amb els períodes pre-PCV7 i post-PCV7 (96). La incidència de MPI causada per serotips inclosos a PCV7 va disminuir posteriorment a la introducció de PCV7 i va continuar disminuint amb la introducció de PCV10/13: la incidència per cada 100.000 habitants era 16.5 abans de PCV7, 3.6 durant el període PCV7 i 0.5 després de PCV10/13 (96).

La incidència per cada 100.000 habitants de MPI causada pels serotips 1, 5 i 7F fou 1.2 abans de PCV7, 3.4 durant el període PCV7 i 2.1 després de PCV10/13. En el cas dels serotips 3, 6A i 19A la incidència per cada 100.000 habitants fou 2.6 abans de PCV7, 3.4

durant el període PCV7 i 2.4 després de PCV10/13 (96).

En resum, l'epidemiologia de la MPI ha canviat significativament a Europa amb la introducció de la vacunació antipneumocòccica. La incidència global de MPI ha disminuït sobretot a causa del descens de MPI per serotips vacunals i per l'efecte protector de grup. Després de 7-10 d'anys d'haver introduït PCV7, la incidència de MPI causada per serotips inclosos a PCV7 és molt baixa o pràcticament nul·la en la població pediàtrica de països amb elevada cobertura vacunal com Bèlgica, Dinamarca, França, Noruega o Regne Unit (91,92). La prevalença de MPI causada per serotips no inclosos a PCV7 va augmentar posteriorment a la introducció de la vacuna, especialment 19A, 7F, 3 i 1 (91,96). Amb la introducció de PCV10 i PCV13 es va observar una reducció addicional ràpida i significativa de serotips inclosos en aquestes vacunes passant d'una proporció de MPI per serotips inclosos a PCV13 en menors de 5 anys del 61-73% en el període post-PCV7 al 15-53% en el període post-PCV13. La reducció fou principalment conseqüència d'una disminució de MPI causada per 19A, 7F, 1 i 6A.

1.4.2.3 Epidemiologia i impacte de la vacunació a Espanya i Catalunya

Abans de la introducció l'any 2001 de PCV7, Espanya era un dels països amb major resistència als antibiòtics (97). Els serotips 6, 9, 14 i 23 concentraven el 83% dels casos de resistència a penicil·lina en el nostre medi. Donat que tots aquests serotips estan inclosos en les vacunes antipneumocòcciques, la vacunació va tenir un impacte molt important en la reducció de la proporció de soques de pneumococ causants de MPI resistents als antibiòtics a Espanya (98). Malgrat això, a diferència dels Estats Units, la

vacunació antipneumocòccica conjugada a Espanya no fou incorporada als calendaris de vacunació sistemàtica. Aquest fet provoca una elevada variabilitat en les cobertures vacunals en les diverses regions d'Espanya ja que depèn del poder adquisitiu dels pares (la vacuna no rep finançament públic), de la indicació del pediatre i de l'acceptació de la vacunació per part dels pares. L'any 2006 es va estimar una cobertura vacunal antipneumocòccica en nens menors de 2 anys al voltant del 50% amb PCV7 (95).

La vacunació antipneumocòccica a Espanya no ha tingut l'impacte observat als Estats Units on la vacunació ha estat universal. Globalment es va observar una reducció de la incidència de la MPI després de 2 anys d'haver introduït PCV7 segons dades d'un estudi realitzat al País Basc i Navarra (99). Segons aquest estudi la incidència de MPI va disminuir un 64.3% i un 39.7% en nens menors de 12 i 24 mesos respectivament. A Catalunya també es va detectar un canvi en els serotips causants de MPI en nens menors de 2 anys (100). Les dades d'aquest estudi mostraven que entre 1997-1999 i 2005-2007, la proporció de serotips vacunals causants de MPI a Catalunya va disminuir de 70.5% a 31.6%. En concret a Catalunya, els serotips inclosos a PCV7 responsables de MPI varen disminuir del 21% al 2005 al 13% al 2009 (101).

No obstant, es va observar un augment de MPI per serotips no inclosos en la vacuna heptavalent conjugada (95,102). Un estudi del nostre centre va constatar que la incidència de MPI per serotips o vacunals en menors de 2 anys va passar de 32.4 episodis/100.000 habitants-any en el període prevacunal (1997-2001) a 51.3 episodis/100.000 habitants-any en el període postvacunal (2002-2006) (95). El fenomen també es va observar en estudis publicats per altres centre del nostre entorn (103). Pel que fa a l'augment de MPI per serotips no vacunals, a la nostra àrea geogràfica es va observar especialment un increment de la prevalença dels serotips

19A i 1 així com una emergència de clons virulents relacionats amb els serotips no vacunals 1 i 5 (104,105). També es va notar un canvi en les formes clíniques de MPI ja que la incidència de la pneumònia i/o empiema en nens menors de 5 anys va augmentar un 320% (Figura 3).

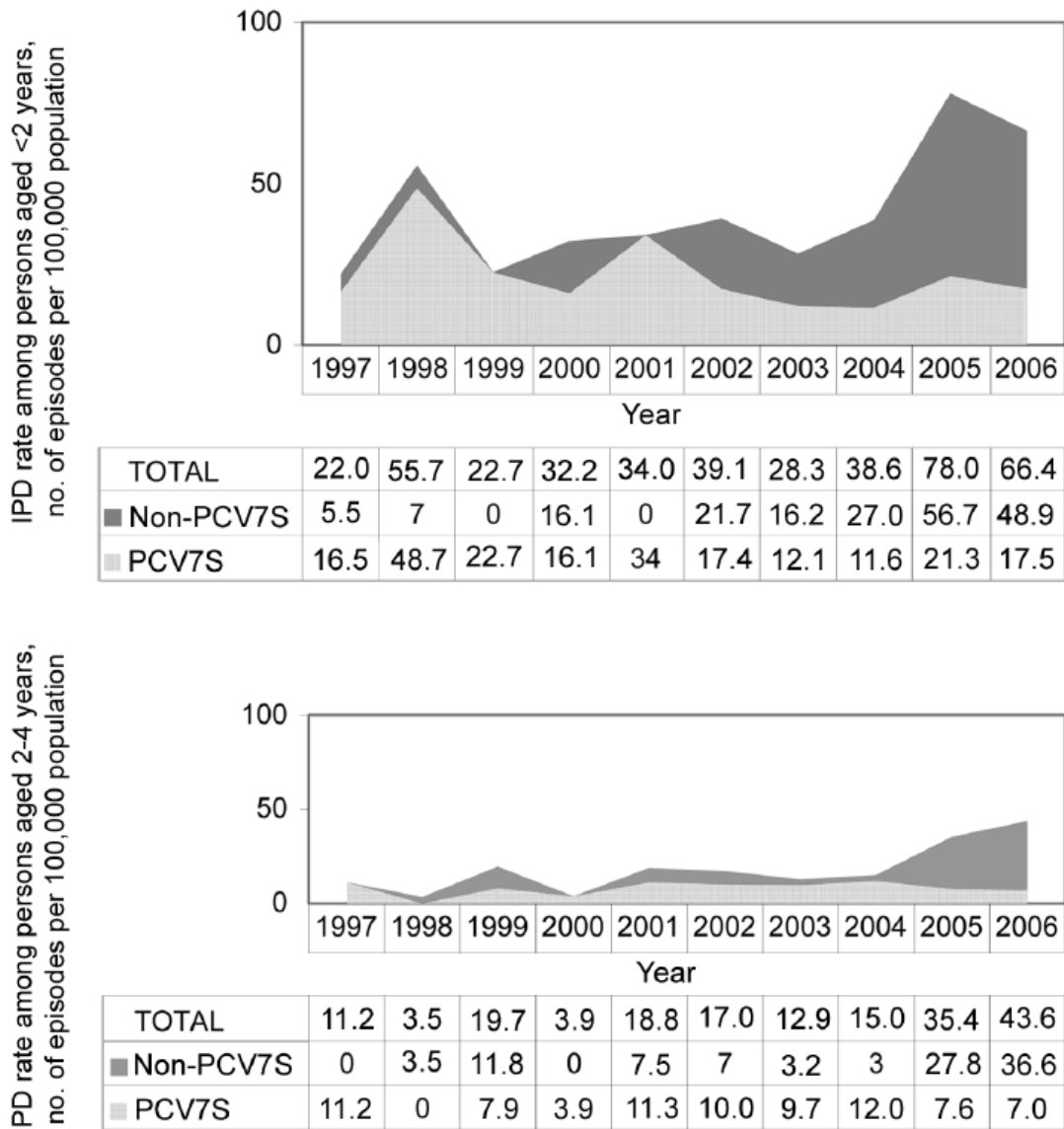


Figura 3. Proporcions de MPI en nens per edat i grup de serotip. PCV7S, vacuna conjugada pneumocòccica 7-valent. Informació extreta de Muñoz-Almagro et al. 2008 (95)

Després de la introducció de PCV10 i PCV13 a Espanya al 2010 s'han publicat diversos estudis per valorar-ne l'impacte. La taxa de vacunació global continua essent diversa segons la comunitat autònoma estudiada. S'han publicat dades de cobertura vacunal antipneumocòccica de Catalunya, Navarra i Madrid que són 64%, 78% i 92% respectivament (96). Per això, malgrat que hi ha hagut una reducció significativa de la MPI causada per serotips inclosos a PCV13 i un augment proporcional de la MPI per serotips no inclosos a PCV13, la MPI causada per serotips inclosos a PCV13 continua essent important probablement a causa de cobertures vacunals baixes. Malgrat aquesta cobertura vacunal baixa, la incidència de MPI per serotips 1, 19A i 7F ha experimentat un descens que en canvi no s'observa en els serotips 3 i 14 (96,106).

1.5. Clínica

S.pneumoniae és un dels patògens més freqüents en les infeccions adquirides en la comunitat, tant en la població pediàtrica com en l'adult. Existeixen diverses formes clíniques de malaltia pneumocòccica invasiva (MPI). En el nostre entorn constitueix l'agent causal més freqüent de bacterièmia, pneumònia simple i complicada, meningitis, otitis i sinusitis aguda. Totes elles són molt freqüents en els menors de 3 anys. Existeixen altres infeccions pneumocòcciques menys comuns com les infeccions dels teixits tous (cel·lulitis orbitàries), erisipela, artritis, osteomielitis, peritonitis primària i endocarditis (56,88,107).

La bacterièmia és la malaltia invasiva més freqüent causada pel pneumococ en nens menors de 3 anys (108,109). El principal risc de la bacterièmia és la progressió a una infecció sistèmica greu. Els nens entre 6 i 24 mesos d'edat són els que es troben en

situació de major risc (110). Generalment, la febre és l'únic símptoma de malaltia i el diagnòstic pot ser a vegades difícil. El risc de bacterièmia es relaciona amb temperatures elevades. S'estima que el risc de bacterièmia és menor a l'1% en nens amb síndrome febril inferior a 39°C (110,111). L'ús de PCV7 i PCV13 ha provocat un descens molt important en la incidència de bacterièmia pneumocòccica en els menors de 2 anys (89).

La pneumònia pneumocòccica adquirida en la comunitat s'inicia generalment amb un quadre infecció de vies respiratòries altes que facilita la colonització del pneumococ de la via respiratòria inferior. Generalment, el sistema de drenatge mucociliar, la tos, els pèptids microbicides i el sistema immunològic local evita la progressió de la infecció pneumocòccica. Si qualsevol d'aquests sistema falla, es desencadena una resposta inflamatòria sistèmica característica de pneumònia bacteriana (2). El quadre es caracteritza per febre, astènia, tos i dispnea. Si no es tracta pot evolucionar a insuficiència respiratòria aguda, xoc sèptic, fallida multiorgànica i la mort. Aquesta presentació típica pot no ser tan evident en els noutats o en els nens amb condicions associades a immunosupressió. Alguns pacients fins i tot poden presentar símptomes extrapulmonars (meningitis, peritonitis, mastoïditis, endocarditis) sense clínica clara de pneumònia.

La meningitis és la manifestació més greu de MPI i generalment és conseqüència de la disseminació del pneumococ des del torrent circulatori cap a les meninges. Posteriorment a la introducció de la vacuna conjugada d'*Haemophilus influenzae* tipus b, *S.pneumoniae* es va convertir en l'agent etiològic principal de meningitis bacteriana en nens fora del període neonatal (112). Abans de la introducció de PCV7, la incidència anual de meningitis pneumocòccica en els nens menors de 2 anys d'edat era

17.3/100.000 habitants i representava fins al 14.1% del total de MPI en els menors de 2 anys i el 3.6% en els nens de 2 a 5 anys d'edat (101,113).

La meningitis pneumocòccica en pediatria té múltiples presentacions clíniques des d'un inici gradual de la simptomatologia o símptomes vagues d'infecció respiratòria de vies altes fins a cursos clínics fulminants que poden provocar la mort en menys de 24 hores després de l'inici de la simptomatologia. Malgrat el diagnòstic precoç, l'inici apropiat d'antibioteràpia i les cures intensives, la morbimortalitat es manté elevada(114). Les seqüeles neurològiques s'han detectat en fins al 56% dels supervivents i la taxa de mortalitat global associada a aquesta infecció s'estima al voltant del 59% (79). Després de la introducció de PCV7/10/13, les taxes d'hospitalització per meningitis pneumocòccica van disminuir notablement (115–117). S'estima que l'impacte global d'aquesta reducció es troba al voltant del 30%. El major descens es va observar entre els menors de 2 anys, on la incidència es va reduir un 64%. En un estudi del nostre grup es va observar que la proporció de casos de meningitis sobre el total de MPI al 2010 i 2013 es va reduir del 10.3% al 6.1% (118)

1.6. Diagnòstic

La detecció i diagnòstic d'infecció per pneumococ es realitza mitjançant mètodes microbiològics tradicionals i/o mètodes moleculars.

Entre els mètodes tradicionals s'utilitza el cultiu (ja sigui en condicions anaeròbiques o amb CO₂ a 37°C), la tinció de gram, l'aglutinació en làtex o la detecció d'antigen urinari (no utilitzat en nens per la seva baixa especificitat). Clàssicament, el cultiu bacterià ha estat la tècnica de referència o "gold-standard". El cultiu microbiològic requereix aïllar i

identificar *S. pneumoniae* d'una mostra estèril i es necessiten de 48 a 72 hores per confirmar el resultat. Es tracta d'una tècnica molt específica però amb una baixa sensibilitat (119) ja que en el cas dels pacients pediàtrics la dificultat per aconseguir una quantitat adequada de mostra o bé l'antibioteràpia prèvia que ha rebut el pacient, poden donar lloc a falsos negatius (120,121). Aquesta baixa sensibilitat ha impulsat la recerca de nous mètodes diagnòstics. Pel diagnòstic de microbiologia molecular s'utilitza la detecció de material genètic específic del pneumococ. Els mètodes basats en la PCR en temps real permeten identificar i quantificar fragments d'ADN del pneumococ en un temps inferior a 3 hores. La PCR té una elevada especificitat i sensibilitat respecte al cultiu (122–124). A més a més, les tècniques basades en PCR no requereixen mantenir viu el bacteri, permeten la detecció del patogen en una mostra de baixa concentració i permeten quantificar la càrrega bacteriana de l'ADN del pneumococ, que pot ser útil pel diagnòstic i maneig clínic dels pacients (122). Aquesta tècnica ha estat validada pel nostre grup de recerca de l'Hospital Sant Joan de Déu. El procediment consisteix en la detecció de gens típics del pneumococ (ex gens que codifiquen estructures de la càpsula, pneumolisina, etc.), un de tipus genèric i un altre del polisacàrid capsular (122). La detecció de seqüències conservades en gens de *S. pneumoniae* com la pneumolisina (gen *ply*) (125) o l'autolisina (gen *lytA*) (126) mitjançant PCR o PCR en temps real aplicada a mostres estèrils ha incrementat el diagnòstic microbiològic de la MPI (127).

El serotipatge de les soques de pneumococ també es pot realitzar per mètodes clàssics o mitjançant la detecció d'ADN. Els mètodes clàssics, per a l'estudi del polisacàrid capsular, basats en el cultiu, inclouen la reacció de Quellung (128), considerada el "gold-standard", l'aglutinació en làtex (129), la co-aglutinació (130) i l'assaig dot-blot

(131). L'elevat cost dels antisèrums, la subjectivitat en la interpretació o els requeriments tècnics especialitzats són alguns dels inconvenients que presenten aquests mètodes. A més a més, es requereix mantenir el bacteri viu, fet que esdevé un inconvenient en el cas dels cultius negatius.

Els mètodes moleculars basats en la detecció de l'ADN permeten solucionar alguns dels inconvenients associats al cultiu (tals com la reducció del cost i temps de treball) i s'han desenvolupat tècniques de PCR pel serotipatge del pneumococ a partir de mostres de pacients amb cultiu negatiu (119,124,132,133). Aquestes tècniques es basen en la detecció de gens presents en el locus cps, flanquejat pels gens *dexB* i *aliA*. Actualment també s'utilitza la tecnologia *microarray* pel serotipatge del pneumococ. Aquesta tecnologia permet l'anàlisi de diferents paràmetres en un sol experiment. Els mètodes basats en *microarray* són relativament ràpids, sensibles i adequats per a processar assaigs amb un elevat rendiment (134), no només per discriminar serotips sinó també obtenir informació de l'estructura del polisacàrid capsular (135).

Per a la caracterització genètica de *S. pneumoniae* s'utilitzen diverses tècniques. Una de les més utilitzades és la tècnica MLST 1. Aquesta tècnica està basada en els principis de la tècnica MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) que analitza els fragments interns de 7 gens *housekeeping* que codifiquen enzims metabòlics mitjançant la seqüenciació de l'ADN (136). Per cada gen, les diferents seqüències corresponen als al·lels dels 7 loci que donen lloc a un perfil al·lèlic que defineix el *sequence-type* (ST) de cada soca.

Una altra tècnica utilitzada pel genotipat és la MLVA (*Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis*). Aquest mètode es basa en la variació natural en el nombre de seqüències d'ADN repetides en tàndem que té lloc en diversos llocs del genoma (137).

S'estudien així 8 locus que s'amplifiquen en dues reaccions de PCR multiplex i posteriorment s'analitzen fragments dels productes amplificats marcats amb fluorescència.

1.7. Mannose-binding lectin (MBL)

1.7.1 Generalitats

La lectina unida a manosa (*MBL*, de l'anglès *Mannose-binding lectin*) és una proteïna proinflamatòria sintetitzada al fetge i que circula en el sèrum que està implicada en l'activació del complement a través de la via de les lectines i és un sistema de defensa immediata de l'hoste contra les infeccions (138–140). Per tant, la *MBL* juga un paper important en els mecanismes de defensa de l'hoste (69).

La *MBL* actua en el reconeixement d'estructures pròpies dels patògens, principalment carbohidrats. Actua com a promotor de l'opsonofagocitosi i té la capacitat d'activar la cascada del complement independentment de la resposta d'anticossos (139,141–144). La *MBL* es considera un *pre-anticòs* amb un paper defensiu rellevant en fases inicials de la vida, moment en el qual el sistema immunològic adaptatiu encara és immadur.

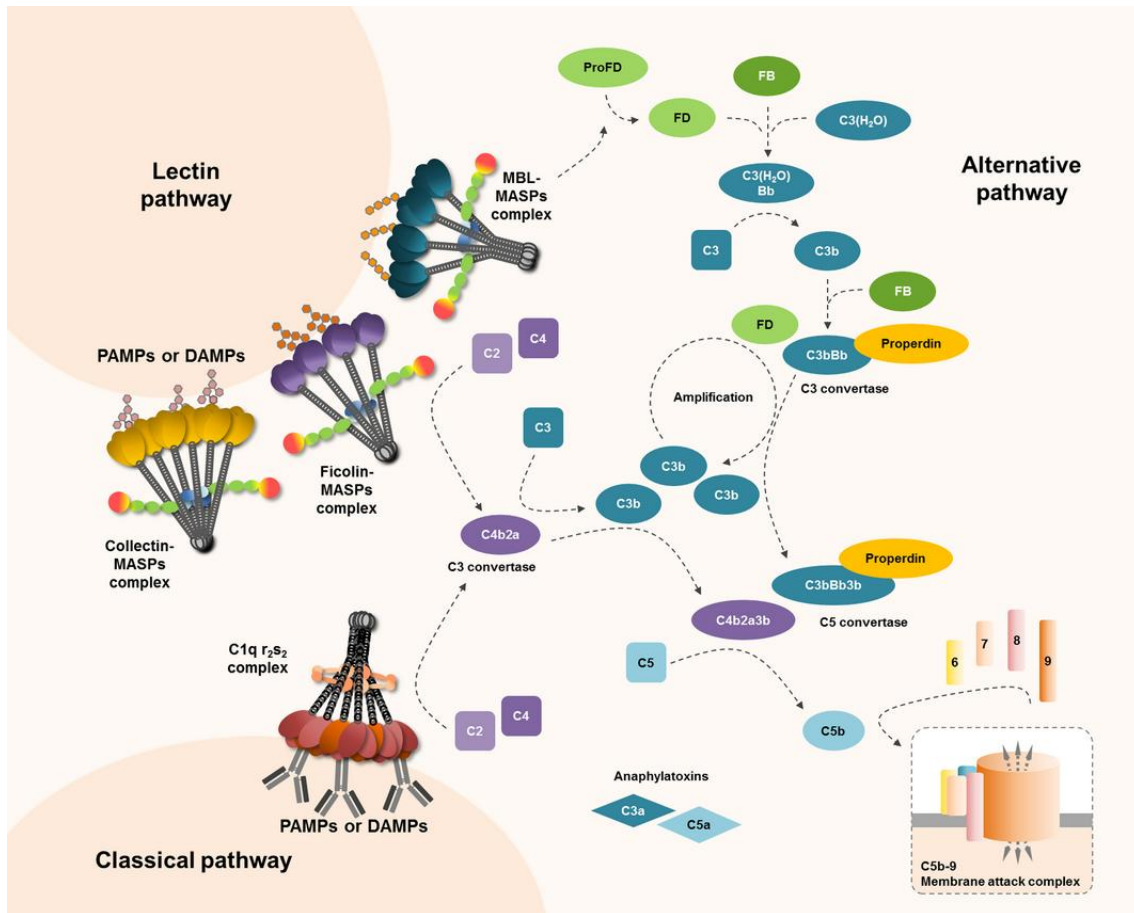


Figura 4. Relació sistema del complement i MBL

Il·lustració extreta de la revista Immunological Reviews (145)

1.7.2 Gen *MBL2* i polimorfismes

El gen *MBL2* es localitza al cromosoma 10 en la posició 10q11.2-q21 i està format per 4 exons i 3 introns (146).

La organització de *MBL2* és complexa. Aquest gen conté dues localitzacions d'inici de transcripció que dona lloc a una proteïna sèrica que té capacitat per induir respostes de IL-6 i de glucocorticoides. Els exons 1, 2 i codifiquen regions riques en glicina que permeten donar estabilitat estructural a la proteïna MBL. L'exó 4 codifica el domini de reconeixement de carbohidrats mitjançant el qual la MBL s'uneix als microorganismes

(bactèries gram positives i negatives, virus i protozous) (147,148). MBL també pot unir-se a fosfolípids, àcids nucleics i cèl·lules apoptòtiques i necròtiques (149).

En el torrent sanguini, la MBL forma complexes amb les proteases associades a MBL (MASP) (150). Els complexes MBL-MASP tenen la capacitat per transformar C3 en C3a i C3b i activar la cascada del complement (151).

1.7.3 Polimorfismes de MBL2 i nivells de MBL

Els nivells sèrics de MBL en la població sana presenten una elevada variabilitat de l'ordre de 2-3 logaritmes de magnitud (152) pel que cal tenir en consideració aspectes tècnics i conceptuals. Tècnicament, els nivells plasmàtics de MBL es quantifiquen mitjançant tècniques de ELISA i diversos estudis han mostrat una elevada variabilitat segons la tècnica usada (143,153). Conceptualment, el coneixement actual manté que els nivells plasmàtics de MBL depenen bàsicament del genotip de *MBL2* (152,154,155). Així, la concentració plasmàtica de *MBL* queda determinada genèticament com a conseqüència d'un polimorfisme de nucleòtid únic (de l'anglès *SNP*, *single nucleotide polymorphisms*) incrustat entre el promotor i l'exó 1 del gen humà *MBL2* (148,156–158). Diverses combinacions en homo- i heterozigosi dels mencionats *SNP* originen diversos genotips responsables de concentracions elevades (A/A, XA/A), intermèdies (O/A, XA/XA) i baixes (O/O, XA/O) dels nivells sèrics de *MBL* (157).

Actualment està també en discussió l'existència de factors no genètics que poden afectar els nivells de MBL. Entre aquests hi ha l'edat, l'estat hormonal i l'activació del sistema immunològic. En primer lloc, els nivells de MBL varien amb l'edat. Els nivells de

MBL augmenten durant els primers mesos de vida i posteriorment disminueixen fins a nivells de l'adult als 12 mesos d'edat (159). Els nounats prematurs tenen nivells inferiors de MBL en comparació amb els nounats a terme (160). Les dones solen tenir nivells més elevats de MBL que els homes (161). En segon lloc, les hormones tiroidees i la hormona del creixement tenen un impacte en els nivells sèrics de MBL (el dèficit d'hormona tiroidea i/o hormona de creixement es correlaciona amb el dèficit de MBL) (162). En tercer lloc, la MBL és una proteïna reactant de fase aguda i els seus nivells augmenten en resposta a un procés inflamatori o infecció (163).

1.7.4. Impacte clínic dels nivells de MBL

Diversos estudis publicats conclouen que el dèficit de *MBL* determinat genèticament és relativament freqüent en les poblacions humanes analitzades (varia entre una prevalença < 15% en les poblacions caucàsiques al 20% de la població africana subsahariana) (164,165). No obstant, existeix molta controvèrsia en la definició del que es considera "dèficit de MBL" i el seu impacte clínic. Tot i això, si ens centrem en el paper de la MBL com un factor essencial en l'activació del complement, sembla evident que els nivells baixos de MBL poden ser contraproductius en aquelles circumstàncies en què la integritat del sistema immunològic innat és essencial per mantenir la protecció contra les infeccions, especialment aquelles ocasionades per microorganismes capsulats.

Així, el dèficit de MBL s'ha relacionat amb un augment de susceptibilitat a les malalties infeccioses, incloent aquelles causades pel pneumococ, tot i que amb resultats

discrepants (166). L' *S.pneumoniae* ha mostrat una capacitat d'unió baixa-intermèdia a la *MBL* (167,168) i els nivells sèrics baixos de *MBL* han estat associats a un increment 5 vegades superior de mort associada a malaltia pneumocòccica (166). S'han publicat diversos estudis que mostren que el dèficit de *MBL* és un factor de risc per desenvolupar MPI (141,166,169,170), infeccions respiratòries greus en nounats i infants (171,172), càrregues bacterianes elevades en sèpsies meningocòcciques en infants (173), un major risc i duració de complicacions infeccioses en nens amb neoplàsies malignes (174,175) i augmenta la gravetat i el mal pronòstic en els adults que pateixen pneumònia (176). No obstant, existeixen també altres estudis que mostren resultats contradictoris respecte a la relació entre el nivells baixos de *MBL* determinats genèticament i el risc de MPI en poblacions pediàtriques i adults (141,177–181).

2. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

1. Justificació i Hipòtesis

Com hem desenvolupat al llarg de la introducció, la malaltia pneumocòccica invasiva és un problema seriós i freqüent en els països desenvolupats. La seva prevalença és elevada en les primeres i últimes etapes de la vida i en grups de població específics amb determinades patologies cròniques o estats d'immunosupressió congènits o adquirits. El pic de major incidència es produeix en l'edat pediàtrica, especialment durant la infància. L'impacte de la malaltia és important ja que associa una elevada mortalitat però també una elevada morbiditat. Els supervivents de la malaltia pneumocòccica invasiva tenen majors taxes de sordesa, convulsions o alteracions del desenvolupament neurocognitiu entre d'altres. És també durant la infància on els defectes immunològics poden tenir un major impacte en la freqüència i agressivitat de les infeccions. La immunitat innata constitueix el principal mecanisme de defensa en aquest moment del desenvolupament i coincideix amb el pic d'incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva.

Així doncs, donada l'absència d'evidència en la literatura científica de dades concloents que relacionin els factors immunològics que predisposen als nens a la malaltia pneumocòccica invasiva amb les característiques de la infecció i el grau d'invasivitat del pneumococ, es va creure oportú iniciar un estudi observacional prospectiu al nostre centre (Hospital Universitari Sant Joan de Déu) per tal de descriure les característiques etiopatogèniques i immunitàries del nen amb malaltia pneumocòccica invasiva. Posteriorment, es va decidir avaluar retrospectivament la presència de factors que alteren la immunitat innata en una cohort de pacients supervivents d'un episodi de meningitis pneumocòccica, ja que es tracta de la forma clínica de malaltia

pneumocòccica invasiva amb major morbimortalitat. Aquest segon estudi també serviria per contrastar els resultats del primer estudi en una població de característiques diferents.

Els resultats d'aquests treballs ens havien de permetre conèixer:

- El perfil del nen que pateix malaltia pneumocòccica invasiva en la nostra zona, així com tenir una valoració sobre l'impacte de la malaltia a nivell de morbimortalitat en l'edat pediàtrica
- Quines són les formes clíniques prevalents de MPI en l'edat pediàtrica i quins factors condicionen l'ingrés a les unitats de cures intensives i/o allarguen l'estada hospitalària.
- Quin és el perfil vacunal dels pacients que pateixen MPI i la seva relació amb les formes clíniques de MPI i invasivitat del pneumococ.
- Conèixer les freqüències de genotips de *MBL2* en la nostra mostra de pacients amb MPI i relacionar-ho amb les formes clíniques de MPI i invasivitat del pneumococ
- Conèixer la relació entre els genotips de *MBL2* associats a dèficit sèric de MBL i la seva associació a variables epidemiològiques
- Conèixer específicament les característiques clíniques, el perfil vacunal, el genotip de *MBL2* i les característiques d'invasivitat del pneumococ en una cohort pediàtrica supervivent de meningitis pneumocòccica.
- Definir els factors que augmenten el risc de patir MPI per establir tractaments orientats a disminuir la morbimortalitat associada a aquesta patologia

- Identificar quins pacients es podrien beneficiar d'estratègies de prevenció o un maneig més agressiu durant l'episodi agut de MPI per millorar-ne el pronòstic

S'establiren les següents hipòtesis de treball:

1. Els nens amb malaltia pneumocòccica invasiva presenten una elevada proporció de defectes de la immunitat innata (tals com el dèficit de *MBL*) respecte a d'altres grups de població.
2. Els nens amb meningitis pneumocòccica presenten una elevada proporció de defectes de la immunitat innata.
3. Els nens amb defectes de la immunitat innata presenten formes clíniques de MPI més agressives i amb major morbimortalitat.
4. Els defectes de la immunitat innata modulen la forma clínica de MPI en relació al perfil d'invasivitat associat al serotip de pneumococ.

3. OBJECTIUS

2. Objectius

D'acord amb les hipòtesis descrites, els objectius plantejats en els dos estudis que conformen la Tesi doctoral són:

1. **Primer estudi:** *High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in young children with invasive pneumococcal disease.* Clinical Microbiology and Infection (2014); 20: O745-O752.

Objectiu general

- 1.1 Conèixer les característiques epidemiològiques, clíniques i microbiològiques dels pacients amb malaltia pneumocòccica invasiva
- 1.2 Determinar la prevalença de genotips responsables de nivells baixos de *MBL* sèrica en pacients amb malaltia pneumocòccica invasiva

Objectius específics

- 1.3 Descriure les característiques demogràfiques, clíniques, microbiològiques i genotípiques segons grup d'edat en pacients amb malaltia pneumocòccica invasiva
- 1.4 Avaluar si existeixen diferències en la prevalença de genotips responsables de nivells baixos de *MBL* sèrica en pacients amb malaltia pneumocòccica invasiva segons l'edat del pacient, el potencial invasiu associat al serotip, la forma clínica de MPI o la necessitat d'ingrés a la UCIP

2. **Segon estudi:** *Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants.* PLOS ONE (2017) 12(5): e0178377.

Objectiu general

- 2.1 Descriure la susceptibilitat a meningitis pneumocòccica en pacients pediàtrics segons el potencial invasiu del serotip i els genotips associats a dèficit sèric de *MBL*

Objectius específics

- 2.2 Descriure les característiques demogràfiques, clíniques, microbiològiques i genotípiques en pacients pediàtrics amb meningitis pneumocòccica
- 2.3 Avaluar les diferències entre els genotips de *MBL2* segons variables epidemiològiques, clíniques i microbiològiques en pacients pediàtrics amb meningitis pneumocòccica.

4. RESULTATS

3. Resultats

Els resultats dels dos estudis presentats han estat publicats en dos articles que es presenten a continuació dels quals el doctorand n'és primer i segon autor. Aquests dos articles s'han publicat en revistes situades en el primer quartil de factor d'impacte en les seves àrees de coneixement.

Primer article:

High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in Young children with invasive pneumococcal disease

C. Muñoz-Almagro, C. Bautista-Rodriguez, M. T. Arias, R. Boixeda, E. del Amo, C. Borrás, N. Armiger, L. Garcia, G. Sauca, L. Selva, M. F. de Sevilla, P. Ciruela, J. C. Yebenes, R. Pallares, F. Lozano

Clinical Microbiology and Infection 2014; 20: O745-O752

<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12615>

ISI Journal Citation reports® Ranking 2015: 16/264 (Medicine, Infectious Diseases), Q1

Impact Factor: 4.575

Segon article:

Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants

C. Bautista-Rodriguez, C. Launes, I. Jordan, M. Andres, M.T. Arias, F. Lozano, JJ Garcia-Garcia, C. Muñoz-Almagro

PLOS ONE 2017; 12(5): e0178377

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377>

ISI Journal Citation reports® Ranking 2015: 209/1779 (Medicine), Q1

Impact Factor: 3.057

Primer article:

***High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in
Young children with invasive pneumococcal disease***

C. Muñoz-Almagro, C. Bautista-Rodríguez, M. T. Arias, R. Boixeda, E. del Amo,
C. Borrás, N. Armiger, L. García, G. Sauca, L. Selva,
M. F. de Sevilla, P. Ciruela, J. C. Yébenes, R. Pallares, F. Lozano

Article publicat a

Clinical Microbiology and Infection 2014; 20: O745-O752

<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12615>

High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in young children with invasive pneumococcal disease

C. Muñoz-Almagro¹, C. Bautista², M. T. Arias³, R. Boixeda⁴, E. del Amo¹, C. Borrás², N. Armiger^{3,5}, L. García⁶, G. Saucá⁷, L. Selva¹, M. F. de Sevilla², P. Ciruela⁸, J. C. Yébenes⁶, R. Pallares⁹ and F. Lozano^{3,5,10}

1) Molecular Microbiology Department, 2) Paediatrics Department, Hospital Universitari Sant Joan de Deu and University of Barcelona, Esplugues, 3) Department of Immunology, Hospital Clinic of Barcelona, 4) Department of Internal Medicine, Hospital de Mataró – Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, 5) Group of Immunoreceptors, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 6) Department of Paediatrics and Intensive Care, 7) Department of Microbiology, Hospital de Mataró – Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, 8) Public Health Agency, Government of Catalonia, 9) Infectious Diseases, Idibell, Ciberes, Campus Bellvitge, and 10) Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Susceptibility to invasive pneumococcal disease (IPD) correlates with age, younger children being the group with the highest burden of disease. The relevance of the innate immune response and particularly the role of mannose-binding lectin (MBL) in combating IPD is not well known. This is a 2-year prospective study (February 2011 to March 2013) including patients with IPD who attended two hospitals from Catalonia, Spain. Variables including attack rate of pneumococcal serotype (high or low invasive potential serotypes) and genotypes associated with low serum MBL levels were recorded. One hundred and forty-seven patients were included in the study. One hundred and two (69.4%) patients were children or adolescents <18 years and 45 (30.6%) were adults. Overall, low-MBL genotypes (O/O; XA/O) were detected in 23 (15.6%) patients. Children <2 years showed a higher frequency of low-MBL genotypes compared with other patients (31.0% vs. 11.9%; $p = 0.031$). Further sub-analysis revealed a higher proportion of low-MBL genotypes in children <2 years with IPD caused by opportunistic or low-attack-rate serotypes when compared with older patients (46.2% vs. 13.2%; $p = 0.02$). However, no statistically significant differences between the two groups were observed when including patients infected with invasive or high-attack-rate serotypes (18.8% vs. 10.0%; $p = 0.59$). Our data suggest that young children with a genetically determined low-MBL production are at a higher risk of developing IPD, particularly that caused by opportunistic or low-attack-rate pneumococcal serotypes.

Keywords: molecular methods, paediatrics, pneumococcal disease, *Streptococcus pneumoniae*

Original Submission: 12 November 2013; Revised Submission: 18 February 2014; Accepted: 2 March 2014

Editor: J.-L. Mainardi

Article published online: 7 March 2014

Clin Microbiol Infect 2014; 20: O745–

O752 10.1111/1469-0691.12615

Corresponding author: C. Muñoz-Almagro, Department of Molecular Microbiology, Hospital Sant Joan de Deu, University of Barcelona, P Sant Joan de Deu n 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain
E-mail: cma@hsjdbcn.org

Prior presentation: This study was first presented in part at the 31st Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID 2013), Milan, Italy, 28 May to 1 June 2013. XI European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus (EuroPneumo 2013), Madrid, Spain, 28–31 May 2013.

Introduction

Invasive pneumococcal disease (IPD) is a serious health problem in children and adults, and causes almost one million childhood deaths worldwide every year [1]. *Streptococcus pneumoniae* usually colonizes the nasopharynx of healthy children but is less frequently found as a colonizer in adults. It is estimated that most children are colonized by pneumococcus

at least once during the first 2 years of life and nasopharyngeal colonization is the first step towards development of mucosal and invasive diseases [2]. Further spread of pneumo-coccus to the bloodstream and other normally sterile sites occurs less often. However, young children, young adults with immunosuppressive and chronic conditions and older adults are at higher risk of IPD. The complex interaction between impaired host factors and the presence of virulence determi-nants of the pneumococcus may be responsible for developing IPD [2].

The main virulence factor for pneumococcus is the polysaccharide capsule, with more than 94 serotypes that cause varying rates of carriage and IPD. Some of these serotypes have 'low attack rate' and are frequently detected in carriers. These so-called 'opportunistic serotypes' are more prevalent in children <2 years old, elderly people and patients with co-morbidities [3]. In contrast, serotypes with a 'high attack rate', also called 'high-invasive potential serotypes', are seldom detected in carriers and often cause IPD, particularly in older children and adults without co-morbidities [4,5]. Intriguingly, serotypes with a high attack rate, such as serotypes 1, 5 or 7F, have been associated with a less complicated course of disease and lower mortality rates than opportunistic serotypes [6,7], whereas serotypes with a low attack rate have been related to high mortality and more serious clinical manifestations, such as meningitis and sepsis [8].

Mannose-binding lectin (MBL) is a serum protein of the innate immune system, which recognizes pathogen structures, mainly of a carbohydrate nature. It can then promote opsonophagocytosis of a wide range of microorganisms and subsequent antibody-independent complement activation [9,10]. It is considered a pre-antibody that has a relevant defensive role in the first period of life, when an immature adaptive immune system still exists. The serum levels of MBL are genetically determined as a consequence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) embedded into the promoter and the exon 1 of the human MBL2 gene [11]. Homo- and heterozygous combinations of those SNPs give rise to different genotypes responsible for high (A/A, XA/A), intermediate (O/A, XA/XA) or low (O/O, XA/O) serum MBL levels [12]. Previous reports indicate that genetically-determined MBL deficiency is relatively frequent in all human populations analyzed (ranging from <15% in Caucasian populations to 20% in sub-Saharan African populations) [13,14]. This deficiency has been linked to increased susceptibility to infectious diseases, including those caused by pneumococcus [15]. Nonetheless, this hypothesis remains controversial because some studies have not observed a significant association of MBL deficiency with the development of IPD [16].

The aim of this study was to evaluate the prevalence of genotypes responsible for low serum MBL levels in patients with IPD according to age group and serotype attack rate characteristics. This information could be useful for designing strategies for prevention and personalized treatment of patients based on previous analysis of host-pathogen interac-tions.

Patients and Methods

Participant recruitment

This is a prospective study that includes all patients with IPD who attended two medical centres (Hospital Sant Joan de Deu and Hospital de Mataro) from 1 February 2011 to 1 March 2013. The Hospital Sant Joan de Deu (HSJD) is a 360-bed referral paediatric centre located in the metropolitan area of Barcelona, which annually captures around 17% of all hospi-talizations (c. 200 000 children) from the population <18 years in Catalonia (Spain). The Hospital de Mataro (HM) is a public general hospital that covers a catchment area of 400 000 inhabitants from the Catalanian area of Maresme.

Only one episode (the first) per patient was included in the study sample. Patients with functional deficit of classical or alternative pathways of complement activation were excluded from the study, as well as patients with immunocompromised conditions (HIV infection, immunoglobulin deficit), cystic fibrosis, bronchiectasis or cerebrospinal leak.

Demographic and clinical variables including age, sex, ethnicity, IPD risk factors, pneumococcal vaccination status, pneumococcal serotypes and their invasiveness potential, MBL production levels, clinical diagnosis, course of disease, length of hospital stay (LOS) and admission to intensive care unit (ICU) were registered for each episode.

The study was performed following the guidelines of the Ethics Committees of Hospital Sant Joan de Deu and Hospital de Mataro.

Microbiological and immunological methods

Invasive pneumococcal disease was defined as the presence of clinical findings of infection (which were used for classification of disease) together with isolation of *Streptococcus pneumoniae* and/or DNA detection of the pneumolysin (ply) gene and an additional capsular gene of *S. pneumoniae* by real-time PCR in plasma, cerebrospinal fluid or any other sterile fluid. All pneumococcal isolates were identified by standard microbiological methods. DNA detection of the pneumolysin (ply) gene by real-time PCR in normal sterile fluids was performed according to a previously reported assay [17]. Serotyping of strains isolated by culture was carried out by a molecular

technique based on automated fluorescent fragment analysis, which allows differentiation of 40 serotypes [18]. Detection of pneumococcal serotypes in culture-negative clinical samples was performed by multiplex real-time PCR methodology [19]. Both molecular techniques were performed at the Molecular Microbiology Department of Hospital Sant Joan de Deu, which operates as the regional support laboratory for pneumococcus surveillance in Catalonia. Quellung reaction performed at the National Center for Microbiology (Majadahonda, Madrid) was used to complete serotyping in strains isolated by culture.

Serotypes were classified according to the studies of Brueggemann [4] and Sleeman [5]: 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C and 19A were considered to have a 'high attack rate' whereas the remainder were considered to be non-invasive or opportunistic serotypes with a 'low attack rate'.

MBL2 polymorphism analysis

DNA extraction, amplification and genotyping of MBL2 were carried out as previously described [20]. Six single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5⁰-flanking/promoter region (550 G/C, 221 C/G, 4 C/T) and exon 1 (codon 52 CGT/ TGT, codon 54 GGC/GAC and codon 57 GGA/GAA) of the

MBL2 gene were analysed using a polymerase chain reaction (PCR) and sequence-based typing (SBT) technique. The SNPs at codons 52, 54 and 57 are named D, B and C variants, respectively, and are major determinants of serum MBL levels [10,11]. These variants are collectively named O, while A indicates the wild-type variant. The SNPs at positions 551 (H/L), 221 (X/L) and +4 (P/Q) also influence serum MBL levels in individuals with the wild-type A variant [16]. However, the functional effects of H/L and P/Q SNPs appear to be minor compared with L/X, X being the allele associated with lower MBL expression. Accordingly, haplotype combinations O/O and O/XA were considered as low-MBL producing genotypes, O/A and XA/XA as intermediate-producing, and A/A and XA/A as high-producing genotypes.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Sciences software (SPSS Statistics for Windows, version 20.0, IBM Corp., Chicago, IL, USA). Continuous variables were summarized as means and standard deviations (SDs) or as medians and interquartile ranges (IQR, 25th to 75th percentile) according to their homogeneity. Categorical variables were compared with the chi-squared test or the Fisher's exact test (two-tailed) when appropriate. Continuous variables were compared with the Mann-Whitney U-test or Student t-test according to their homogeneity. Significance was set at a two-sided p-value of <0.05 for all statistical analyses. p-values were corrected according to the Holm

method for multiple comparisons. An eligible population of 170 subjects was expected to be collected in the two hospitals during the study period, according to incidence rates of previous years. Based on results described in previous studies, proportions of low vs. medium-high MBL levels were assumed to be 15% and 85%, respectively, while proportions of IPD caused by opportunistic serotypes vs. high-attack serotypes were assumed to be 50% and 50%. The confidence level was set at 95% (two-tailed), precision of confidence interval at 3%, and rate of subjects not meeting inclusion criteria at 10%. It was calculated that the minimum sample size to be recruited for the study needed to include 164 subjects from the eligible population.

Results

A total of 203 IPD episodes among 200 patients were recorded in the two institutions. Of these, 36 patients did not give consent to participate in the study (18%) and 17 did not meet inclusion criteria (two patients with cerebrospinal leak, three patients with HIV infection, and 12 patients with immunosuppression treatment). Thus, the final study sample comprised 147 patients with IPD.

Eighty-five patients (57.8%) were recruited at Hospital Sant Joan de Deu and 62 (42.2%) at Hospital de Mataro. The predominant gender was male (85 patients; 57.8%) and the predominant ethnic group was Caucasian (n = 110; 74.8%). Children or adolescents <18 years of age were also the predominant age group (n = 102; 69.4%). The median age of paediatric patients was 2.9 years (IQR, 1.7–5.3 years) while the median age of adults was 54.0 years (IQR, 47.1– 77.6 years). Pneumonia was the most frequent clinical diagnosis (n = 125; 85.0%); 66 subjects had complicated pneumonia. This was followed by meningitis (n = 12; 8.2%) and bacteraemia/sepsis (n = 10; 6.8%). One hundred and thirty-seven (93.2%) patients required hospitalization, with a median LOS of 9.0 days (IQR, 6.0–14.0), and 25 (17.0%) patients required admission to the Paediatric Intensive Care Unit (PICU). Only 45 (30.6%) patients had previously been vaccinated; 15 (10.2%) suffered sequelae and three adults died.

Sixty-five (44.2%) episodes were confirmed only by PCR, 61 (41.5%) by culture and 21 (14.3%) by both PCR and culture. Overall, the rank order of serotypes was serotype 1 (n = 36; 24.5%), serotype 3 (n = 22; 15.0%), serotype 19A (n = 11; 7.5%) and serotype 7F (n = 10; 6.8%). Serotypes included in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine were found in 74 (72.5%) of 102 children and adolescents younger than 18 years and in 21 (46.7%) of 45 adults. Serotypes with a high attack rate were identified in 66 (44.9%) episodes.

Table 1 shows the MBL2 genotype frequencies found in this study. A genotype associated with low production of MBL (O/O; XA/O) was detected in 23 (15.6%) patients, while genotypes associated with intermediate and high MBL production were detected in 45 (30.6%) and 79 (53.7%) patients, respectively. Table 2 shows demographic, clinical, microbiological and genotypical variables of patients according to age group.

Low-MBL genotypes were not found to be significantly associated with the variables of sex, ethnicity, serotype invasiveness and PICU admission. A higher proportion of low-MBL genotypes was observed among patients with meningitis in comparison with other clinical presentations (33.3% vs. 14.1%) but this tendency did not reach a statistically significant value ($p = 0.191$). Children younger than 2 years showed a significantly higher frequency of low-MBL genotypes compared with the other patients (31.0% vs. 11.9%; $p = 0.031$). Nevertheless, correction for multiple comparisons did not confirm significance of this association (corrected p -value = 0.186). Data regarding associations between variables are presented in Table 3.

A sub-analysis of patients by age group (considering children <2 years old vs. other patients) revealed considerable proportions of carriers of low-MBL genotypes among children <2 years old with IPD caused by opportunistic serotypes (46.2%), diagnosed with meningitis (42.9%), admitted to the ICU (40%) and of Caucasian ethnicity (36.8%). When comparing the frequency of low-MBL genotypes in these younger children and in other patients, ratios of proportions (R) between the two age groups were found to be statistically significant in Caucasian patients ($p = 0.013$) and in patients with IPD caused by opportunistic serotypes ($p = 0.020$). These results are recorded in Table 4.

TABLE 1. MBL2 genotype frequencies in 147 patients with invasive pneumococcal disease

| MBL genotype group | Frequencies | % |
|--------------------|-------------|------|
| YA/YA | 42 | 28.6 |
| YA/XA | 37 | 25.2 |
| XA/XA | 6 | 4.1 |
| Overall A/A | 85 | |
| YA/YB | 21 | 14.3 |
| XA/YB | 6 | 4.1 |
| YA/YC | 7 | 4.8 |
| XA/YC | 2 | 1.4 |
| YA/YD | 11 | 7.5 |
| XA/YD | 2 | 1.4 |
| Overall A/O | 49 | |
| YB/YB | 4 | 2.6 |
| YB/YC | 3 | 2.0 |
| YB/YD | 4 | 2.6 |
| YC/YC | 1 | 0.7 |
| YC/YD | 0 | 0 |
| YD/YD | 1 | 0.7 |
| Overall O/O | 13 | |

Discussion

Susceptibility to IPD has been reported to be clearly related to age, and younger children are the group with the highest burden of disease [1,3]. The importance of the innate immune response in combating infections is well documented. Contrary to adaptive immunity, which takes days to generate and expand a specific humoral and/or cellular response against the pathogen, the innate response acts immediately (within minutes or hours). This innate immune system acts as a first-line defensive barrier, which is critical to contain the passage of nasopharyngeal colonizers to normally sterile sites until lymphocytes and specific antibodies take action [21]. It is also well known that the type and magnitude of the adaptive immune response vary with age, developing from immaturity at birth to maturity after the first 2 years of life, although it takes even longer for the adaptive immune system to fully develop. Therefore, in younger children the fight against infections mainly relies on the innate immune system.

An international study has analysed the association between mortality, clinical manifestations and recovery of invasive serotypes vs. non-invasive serotypes, and has shown that host factors are better predictors of associated morbidity and mortality of IPD than serotype invasiveness [8]. That is, whether an opportunistic serotype will cause disease and/or determine a worse evolution is more strongly related to a deficient host immunological response than to microbiological factors.

In the present study, we found a significantly high proportion of genotypes associated with low MBL production among children younger than 2 years with IPD. Moreover, the frequency of low-MBL genotypes was observed to be especially high (46.2%) in younger children with IPD caused by opportunistic serotypes. These data suggest that pneumococcal nasopharyngeal colonizers have more opportunities to cause invasive disease in young children with a genetically-determined low MBL production, which is a crucial factor in the innate immune response. Interestingly, when rates of low-MBL genotypes among patients with IPD caused by serotypes with high invasiveness (high-attack-rate serotypes) were analyzed, we did not find a significantly high proportion of low-MBL genotypes either in young children aged <2 years or in other patients. Serotypes with a high attack rate are bad colonizers, and different studies have shown that they have important virulence factors associated with the production of pleuropneumonia or other clinical manifestations of IPD [22]. These data suggest that in the case of high-attack-rate serotypes, microbiological factors may proportionally have

TABLE 2. Demographic, clinical, microbiological and genotypical characteristics of patients according to age group

| Characteristics | <2 years | ≥2 and <5 years | ≥5 and <65 years | ≥65 years | Total |
|--|----------------|-----------------|------------------|-------------|---------------|
| Subjects | 29 (19.7) | 45 (30.6) | 56 (38.1) | 17 (11.6) | 147 |
| Sex | | | | | |
| Male | 14 (48.3) | 24 (53.3) | 38 (67.9) | 9 (52.9) | 85 (57.8) |
| Female | 15 (51.7) | 21 (46.7) | 18 (32.1) | 8 (47.1) | 62 (42.2) |
| Ethnicity | | | | | |
| Caucasian | 19 (65.5) | 31 (68.9) | 45 (80.4) | 15 (88.2) | 110 (74.8) |
| Non-Caucasian | 10 (34.5) | 14 (31.1) | 11 (19.6) | 2 (11.8) | 37 (25.2) |
| Clinical manifestation | | | | | |
| Pneumonia | 18 (62.0) | 39 (86.7) | 53 (94.6) | 15 (88.2) | 125 (85.0) |
| Meningitis | 7 (24.1) | 2 (4.4) | 1 (1.8) | 2 (11.8) | 12 (8.2) |
| Bacteraemia/sepsis | 4 (13.8) | 4 (8.9) | 2 (3.6) | 0 | 10 (6.8) |
| ICU admission (n = 137) ^a | | | | | |
| No | 18 (64.3) | 34 (79.1) | 45 (90.0) | 15 (93.8) | 112 (83.0) |
| Yes | 10 (35.7) | 9 (20.9) | 5 (10.0) | 1 (6.3) | 25 (17.0) |
| Clinical course (n = 129) ^a | | | | | |
| No sequelae | 15 (62.5) | 33 (86.8) | 48 (96.0) | 15 (88.2) | 111 |
| Sequelae | 9 (37.5) | 5 (13.2) | 1 (2.0) | 0 | 15 |
| Exitus | 0 | 0 | 1 (2.0) | 2 (11.8) | 3 |
| IPD risk factor (n = 127) ^a | | | | | |
| No | 23 (95.8) | 38 (100.0) | 39 (81.3) | 5 (29.4) | 105 |
| Yes | 1 (4.2) | 0 | 9 (18.8) | 12 (70.6) | 22 |
| Vaccine receipt | | | | | |
| No | 21 (72.4) | 26 (57.8) | 50 (89.3) | 17 (100) | 114 |
| PCV7 | 0 | 16 (35.6) | 6 (10.7) | 0 | 22 |
| PCV10 | 1 (3.4) | 1 (2.2) | 0 | 0 | 2 |
| PCV13 | 7 (24.1) | 1 (2.2) | 0 | 0 | 8 |
| PCV7 & PCV13 | 0 | 1 (2.2) | 0 | 0 | 1 |
| Serotype invasiveness | | | | | |
| High | 16 (55.2) | 17 (37.8) | 31 (55.4) | 2 (11.8) | 66 (44.9) |
| Non-high | 13 (44.8) | 28 (62.2) | 25 (44.6) | 15 (88.2) | 81 (55.1) |
| PCV13 serotype | | | | | |
| No | 7 (24.1) | 13 (28.9) | 19 (33.9) | 13 (76.5) | 52 |
| Yes | 22 (75.9) | 32 (71.1) | 37 (66.1) | 4 (23.5) | 95 |
| MBL levels | | | | | |
| High (A/A) | 10 (34.5) | 22 (48.9) | 36 (64.3) | 11 (64.7) | 79 (53.7) |
| Medium (XA/XA or A/O) | 10 (34.5) | 19 (42.2) | 12 (21.4) | 4 (23.5) | 45 (30.7) |
| Low (X/A or O/O) | 9 (31.0) | 4 (8.9) | 8 (14.3) | 2 (11.8) | 23 (15.6) |
| LOS (days) | 14 (9.3–17.8) | 9 (7.0–11.0) | 8.5 (5.0–12.3) | 7 (5.0–9.0) | 9 (6.0–14.0) |
| ICU LOS days | 2.5 (1.0–18.0) | 1.0 (1.0–2.5) | 1.0 (1.0–8.0) | 0 | 1.0 (1.0–6.5) |

Data are presented as n (%) or median

(IQR). ^aMissing values.

IPD, invasive pneumococcal disease; LOS, length of stay; ICU, intensive care unit; MBL, mannose-binding lectin; PCV7/PCV10/PCV13, 7-valent/10-valent/13-valent pneumococcal vaccine.

TABLE 3. Variable frequencies according to MBL level

| Variables | Patients with low MBL level | Patients with medium/high MBL level | p-Value | Corrected p-value |
|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------|-------------------|
| Age | | | | |
| <2 years old | 9 (31.0) | 20 (69.0) | 0.031 | 0.186 |
| ≥2 years old | 14 (11.9) | 104 (88.1) | | |
| Sex | | | | |
| Male | 14 (16.5) | 71 (83.5) | 0.747 | 1.000 |
| Female | 9 (14.5) | 53 (85.5) | | |
| Ethnicity | | | | |
| Caucasian | 16 (14.5) | 94 (85.5) | 0.526 | 1.000 |
| Non-Caucasian | 7 (18.9) | 30 (81.1) | | |
| Clinical manifestation | | | | |
| Meningitis | 4 (33.4) | 8 (66.7) | 0.191 | 0.955 |
| Pneumonia/bacteraemia/sepsis | 19 (14.1) | 116 (85.9) | | |
| ICU admission (n = 137) ^a | | | | |
| No | 18 (16.1) | 94 (83.9) | 0.826 | 1.000 |
| Yes | 5 (20.0) | 20 (80.0) | | |
| Serotype invasiveness | | | | |
| High | 8 (12.1) | 58 (87.9) | 0.290 | 1.000 |
| Non-high | 15 (18.5) | 6 (81.5) | | |

Data are presented as n (%).

Significant values in bold

numbers. ^aMissing values.

ICU, intensive care unit; PCV13, 13-valent pneumococcal vaccine.

more weight in causing disease, regardless of the quality of the immune response.

Our data about the implication of MBL in the development of IPD in young children are novel but in agreement with studies

performed in mice about the role of MBL in susceptibility to pneumococcal infection [23]. In addition, data also exist documenting the implication of MBL deficiency in other paediatric infectious diseases. A recent systematic review has

TABLE 4. Variable frequencies according to age group and MBL level

| Variables | Age group <2 years (n = 29) | | Age group ≥2 years (n = 118) | | Patients with low MBL level | |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
| | Total number of patients | Patients with low MBL level | Total number of patients | Patients with low MBL level | p-Value | R (95% CI) |
| Ethnicity | | | | | | |
| Caucasian | 19 | 7 (36.8) | 91 | 9 (9.9) | 0.013 | 3.73 (1.58–8.76) |
| Non-Caucasian | 10 | 2 (20.0) | 27 | 5 (18.5) | 1.000 | 1.08 (0.25–4.70) |
| Clinical manifestation | | | | | | |
| Meningitis | 7 | 3 (42.9) | 5 | 1 (20.0) | 0.849 | 2.14 (0.30–15.07) |
| Others | 22 | 6 (27.3) | 113 | 13 (11.5) | 0.121 | 2.37 (1.01–5.56) |
| ICU admission ^a | | | | | | |
| No | 18 | 5 (27.8) | 94 | 13 (13.8) | 0.263 | 2.01 (0.82–4.94) |
| Yes | 10 | 4 (40.0) | 15 | 1 (6.7) | 0.128 | 6.00 (0.78–46.14) |
| Serotype invasiveness | | | | | | |
| High | 16 | 3 (18.8) | 50 | 5 (10.0) | 0.593 | 1.88 (0.50–6.99) |
| Non-high | 13 | 6 (46.2) | 68 | 9 (13.2) | 0.020 | 3.49 (1.50–8.12) |

Significant values in bold numbers. ^aMissing values. R, ratio of proportions; CI, confidence interval; ICU, intensive care unit; PCV13, 13-valent pneumococcal vaccine.

reported a probable association between HIV disease progression and MBL deficiency, and this association was especially high in children <2 years of age [24]. Dommert et al. [25] have reported the influence of MBL in the frequency and duration of infectious complications in children with malignancy. Finally, Koch et al. [26] report a statistical association of MBL insufficiency with the increase of risk of acute respiratory infection in children between 6 and 17 months. These results contrast with those documented in other populations without infectious diseases. A study performed in a cohort of newborns in the Netherlands showed that a low-MBL genotype was only observed in eight of 56 (14.2%) premature newborns and in two of 11 (18.1%) preterm neonates [27]. Another study performed in our geographical area reported a similar percent-age of 15.3% among adults [13].

It was also of interest to find out that younger patients with pneumococcal meningitis showed a high proportion of low-MBL genotypes (42.9%), even though this proportion did not reach statistical significance when compared with the proportion of low-MBL genotypes in older patients. These data are in agreement with a recent study that reports an association between defective MBL genotypes and an increased risk of pneumococcal meningitis [28]. The hypothesis that MBL deficiency could be related to a worse clinical evolution should not be ruled out and deserves further analysis.

The significance of MBL binding *S. pneumoniae* is controversial because studies show low MBL binding to *S. pneumoniae* as well as to other encapsulated bacteria [29]. Therefore, other mechanisms distinct from complement-mediated opsonophagocytosis and bacterial killing of *S. pneumoniae* by MBL could be the basis of the clinical association reported here. In this regard, there is also evidence of direct interaction of MBL with phagocytic cells to promote phagocytosis and modify cellular activation [30], as well as increasing evidence in support of an immunomodulatory effect of MBL [31].

Our study should be interpreted in light of several limitations. First, although the study sample allowed us to obtain statistically significant results, analysis of more extensive populations should be undertaken to confirm our results, particularly in relation to the association between a genetically-determined MBL deficiency and the onset of pneumococcal meningitis. Second, our study does not exclude the putative contribution of other soluble pattern recognition innate immune proteins also potentially involved in the defence of the lungs against *S. pneumoniae* or other bacteria, such as surfactant proteins (SP-A and SP-D) [32], ficolins [33], pentraxins [34] or agglutinin gp-340/DMBT1 [35]. Third, we did not analyse other factors that may be involved in the step from colonization to disease and, in particular, the role of co-infection with respiratory viruses. Viral infection is very common in young children and it has been suggested that the acquisition of a virus damages the epithelial mucosa and promotes the expression of virulence determinants in the pathogen, which are related to adhesiveness to the mucosa and bacterial replication [36]. Moreover, the role of MBL in direct viral neutralization and inhibition of viral spread is well known [37]. Additional analysis is needed to determine whether deficiencies in innate immunity and co-infection with respiratory viruses together create the perfect situation for development of IPD in children.

In conclusion, our findings suggest an association of genetically determined low MBL production and IPD in younger children. Further confirmation of this novel association may open a pathway to the practice of personalized medicine in which paediatricians would not only evaluate the risk of IPD according to clinical, epidemiological and micro-biological characteristics of the episode, but also according to predictive factors derived from the immune characteristics of the host. Our results also support the need to adopt a more integrated approach to the diagnosis and treatment of IPD in

young children in order to achieve better clinical outcomes for this particular group of patients. The challenge of finding a vaccine based on preserved pneumococcal proteins protecting against all serotypes could be the next response in the prevention of pneumococcal disease.

Acknowledgements

We thank Pedro Brotons and Vanessa Martinez for their writing assistance.

Transparency Declaration

This work was supported by Fondo de Investigacion Sanitaria (FIS, project number PI10/02058 and PI13/01729), AGAUR (Expedient number SGR 00136) and Godia Foundation.

References

- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009; 374: 893–902.
- Bogaert D, de Groot R, Hermans P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 144–154.
- Mu--noz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect* 2011; 63: 151–162.
- Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 2003; 187: 1424–1432.
- Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis* 2006; 194: 682–688.
- Grau I, Ardanuy C, Calatayud L et al. Invasive pneumococcal disease in healthy adults: increase of empyema associated with the clonal-type Sweden(1)-ST306. *PLoS One* 2012; 7: e42595.
- Lujan M, Gallego M, Belmonte Y et al. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteraemic pneumonia. *Eur Respir J* 2010; 36: 1073–1079.
- Alanee SR, McGee L, Jackson D et al. Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an international study. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 46–51.
- Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 346–353.
- Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency -revisited. *Mol Immunol* 2003; 40: 73–84.
- Madsen HO, Garred P, Thiel S et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; 155: 3013–3020.
- Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000; 2: 305–322.
- Smithson A, Perello R, Aibar J et al. Genotypes coding for low serum levels of mannose-binding lectin are underrepresented among individuals suffering from noninfectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 447–453.
- Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006; 7: 85–94.
- Eisen DP, Dean MM, Boermeester MA et al. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 510–516.
- Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002793.
- Mu--noz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarrago D, Pallares R. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 327–335.
- Selva L, del Amo E, Brotons P, Mu--noz-Almagro C. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary elec-trophoresis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3451–3457.
- Tarrago D, Fenoll A, Sanchez-Tatay D et al. Identification of pneumo-coccal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 828–834.
- Cervera C, Balderramo D, Suarez B et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplan-tation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1217–1224.
- Bateman SL, Seed PC. Procession to pediatric bacteremia and sepsis: covert operations and failures in diplomacy. *Pediatrics* 2010; 126: 137–150.
- Selva L, Ciruela P, Blanchette K et al. Prevalence and clonal distribution of pcpA, psrP and Pilus-1 among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 2012; 7: e41587.
- Endo Y, Takahashi M, Iwaki D et al. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol* 2012; 189: 5860–5866.
- Israeels J, Scherpbier HJ, Frakking FN, van de Wetering MD, Kremer LC, Kuijpers TW. Mannose-binding lectin and the risk of HIV transmission and disease progression in children: a systematic review. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31: 1272–1278.
- Dommett R, Chisholm J, Turner M, Bajaj-Elliott M, Klein NJ. Mannose-binding lectin genotype influences frequency and duration of infectious complications in children with malignancy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35: 69–75.
- Koch A, Melbye M, Sorensen P et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285: 1316–1321.
- Frakking FN, Brouwer N, Zweers D et al. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clin Exp Immunol* 2006; 145: 5–12.
- Brouwer MC, Bass F, Van der Ende A, van de Beek D. Genetic variation and cerebrospinal fluid levels of mannose binding lectin in pneumococcal meningitis patients. *PLoS One* 2013; 8: e65151.
- Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant micro-organisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 2000 Feb; 68: 688–693.
- Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis* 2001; 184: 1152–1162.
- Sprong T, Jack DL, Klein NJ et al. Mannose binding lectin enhances IL-1beta and IL-10 induction by non-lipopolysaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. *Cytokine* 2004; 21: 28.
- Silveyra P, Floros J. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 1: 407–429.

33. Garred P, Honore C, Ma YJ et al. The genetics of ficolins. *J Innate Immun* 2010; 2: 3–16.
34. Chiarini M, Sabelli C, Melotti P et al. PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients. *Genes Immun* 2010; 11: 665–670.
35. Madsen J, Mollenhauer J, Holmskov U. Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. *Innate Immun* 2010; 16: 160–167.
36. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003057.
37. Kase T, Suzuki Y, Kawai T et al. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology* 1999; 97: 385–392.

Resum del primer article:

Es tracta d'un estudi observacional prospectiu on s'inclouen tots els pacients amb episodis de malaltia pneumocòccica invasiva atesos a l'Hospital Sant Joan de Déu i a l'Hospital de Mataró des de l'1 de febrer de 2011 a l'1 de març de 2013. Es van recollir dades demogràfiques i variables clíniques incloent edat, sexe, ètnia, factors de risc per a MPI i estat de vacunació. També es van recollir dades referents a forma clínica de presentació, evolució de la infecció i seqüeles, ingrés a unitat de cures intensives i temps d'estada hospitalària. Es va realitzar la prova de detecció del pneumococ en líquids humans estèrils mitjançant cultiu i/o detecció d'ADN específic. Tots els pneumococ es van serotipar mitjançant tècniques de microbiologia molecular. Es va determinar el genotip de *MBL2* en tots els pacients inclosos. Es van excloure tots aquells pacients amb dèficit congènit o adquirit del complement així com patologies que cursen amb immunosupressió (infecció per VIH, dèficit d'immunoglobulina), fibrosi quística, bronquièctasis o fístules de líquid cefaloraquidi.

L'Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona) és un centre monogràfic de referència de tercer nivell pediàtric amb 360 llits localitzat a l'àrea metropolitana de Barcelona. El centre assumeix anualment el 17% de totes les hospitalitzacions (aproximadament 200.000 a l'any) en menors de 18 anys de Catalunya (Espanya). L'hospital té una Unitat de Cures Intensives Pediàtriques (UCIP) amb 18 llits, amb capacitat per assumir pacients que requereixen suport circulatori i/o pulmonar amb bomba i membrana d'oxigenació extracorpòria. És centre de referència a l'estat per a pacients neurològics, cardíacs, nens amb neoplàsies hematològiques i tumors sòlids.

L'Hospital de Mataró és un hospital públic general que ofereix serveis sanitaris en una àrea de població d'aproximadament 400.000 habitants situada a les comarques catalanes del Maresme.

Els resultats d'aquest primer estudi són:

1. Característiques epidemiològiques:

- 1.1. Es van recollir un total de 203 episodis de MPI. 36 pacients no van donar el seu consentiment per participar en l'estudi (18%). 17 pacients foren exclosos (dos pacients amb fístula de líquid cefaloraquídi, 3 pacients amb infecció per VIH i 12 pacients amb estat d'immunosupressió congènita o adquirida).
- 1.2. Es van incloure 147 pacients a l'estudi. El 57.8% (n=85) eren homes i el 74.8% (n=110) eren d'ètnia caucàsica. El 69.4% (n=102) dels casos eren menors de 18 anys. L'edat mitjana dels pacients pediàtrics fou 2.9 anys (rang interquartílic, RIQ, 1.7-5.3) mentre que en el grup d'adults fou 54.0 anys (RIQ 47.1-77.6).
- 1.3. Només el 30.6% dels pacients inclosos (n=45) havien rebut vacunació antipneumocòccica.

2. Formes clíniques i hospitalització

- 2.1. La pneumònia fou el diagnòstic clínic més freqüent (85%, n=125). El 52.8% de les pneumònies foren complicades
- 2.2. La meningitis fou el segon diagnòstic més freqüent (8.2%, n=12) i la bacterièmia el tercer (6.8%, n=10).

2.3. El 93.2% (n=137) dels pacients van requerir hospitalització, amb una mitja d'estada hospitalària de 9.0 dies (RIQ 6.0-14.0). El 17% dels pacients (n=25) va requerir ingrés a la UCIP.

2.4. El 10.2% (n=15) dels pacients va presentar seqüeles a causa de la infecció i 3 adults van morir a conseqüència d'aquesta.

3. Perfil microbiològic i immunològic

3.1. El 44.2% (n=65) dels episodis es va confirmar mitjançant PCR, el 41.5% (n=61) es va confirmar amb cultius i el 14.3% restant (n=21) amb ambdós mètodes.

3.2. Els serotips més freqüents foren l'1 (n=36, 24.5%), el serotip 3 (n=22, 15.0%), el serotip 19A (n=11, 7.5%) i el serotip 7F (n=10, 6.8%).

3.3. El 72.5% dels casos de MPI en menors de 18 anys fou causat per serotips inclosos en la vacuna conjugada 13-valent.

3.4. El 44.9% dels casos (n=66) fou causat per serotips amb alt potencial invasiu.

3.5. El 15.6% dels pacients (n=23) tenien un genotip *MBL2* associat a dèficit sèric de MBL.

4. Relació clínica, microbiologia i immunologia

4.1. S'observa una proporció major de genotips *MBL2* associats a dèficit sèric de MBL en pacients amb meningitis respecte a la resta de formes clíniques (33.3% vs 14.1%, p=0.19).

4.2. S'observa una proporció major de genotips *MBL2* associats a dèficit sèric de MBL en menors de 2 anys en comparació a altres edats (31.0% vs 11.9%, p=0.03). No s'observen diferències significatives entre el genotip *MBL2* en

comparació amb el sexe, ètnia, admissió a la unitat de cures intensives o invasivitat del pneumococ.

4.3. En els menors de 2 anys amb genotips *MBL2* associats a dèficit sèric de MBL s'observen proporcions significatives majors de MPI causada per serotips oportunistes (46.2% vs 13.2%, $p=0.02$), formes clíniques de meningitis (42.9% vs 20.9, $p=0.84$), necessitat d'ingrés a UCIP (40.0% vs 6.7%, $p=0.12$) i ètnia caucàsica (36.8% vs 9.9%, $p=0.01$) en comparació als majors de 2 anys.

Segon article:

***Mannose-binding lectin-deficient genotypes
as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants***

C. Bautista-Rodriguez, C. Launes, I. Jordan, M. Andres,
M.T. Arias, F. Lozano, JJ Garcia-Garcia, C. Muñoz-Almagro

Article publicat a

PLOS ONE 2017; 12(5): e0178377

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377>

RESEARCH ARTICLE

Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants

Carles Bautista-Rodriguez¹, Cristian Launes^{1,2}, Iolanda Jordan^{2,3,4}, Maria Andres^{2,5}, Maria Teresa Arias⁶, Francisco Lozano^{4,6,7}, Juan Jose Garcia-Garcia^{1,2,4}, Carmen Muñoz-Almagro^{2,5,8*}

1 Pediatrics Department, University Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain, **2** CIBER de Epidemiologia y Salud Publica (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Pediatric Intensive Care Department, University Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain, **4** School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **5** Molecular Microbiology Department, University Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain, **6** Department of Immunology, Centre de Diagnostic Biomedic, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain, **7** Immunoreceptors of the Innate and Adaptive Systems, Institut Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, **8** School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

* cma@sjdhospitalbarcelona.org



OPEN ACCESS

Citation: Bautista-Rodriguez C, Launes C, Jordan I, Andres M, Arias MT, Lozano F, et al. (2017) Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants. PLoS ONE 12(5): e0178377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377>

Editor: Ray Borrow, Public Health England, UNITED KINGDOM

Received: January 2, 2017

Accepted: May 11, 2017

Published: May 31, 2017

Copyright: © 2017 Bautista-Rodriguez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Plan Nacional de I+D+i, SAF2013-46151-R) (<http://www.mineco.gob.es/>); Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF- (Grant PI13/01729) (<http://www.isciii.es/>) (http://ec.europa.eu/regional_policy/en/funding/erdf/) and the Spanish Network for Research in Infectious

Abstract

Objectives

The objective of this study was to evaluate the role of mannose-binding-lectin deficient genotypes in pneumococcal meningitis (PM) in children.

Methods

We performed a 16-year retrospective study (January 2001 to March 2016) including patients 18 years with PM. Variables including attack rate of pneumococcal serotype (high or low invasive capacity) and *MBL2* genotypes associated with low serum MBL levels were recorded.

Results

Forty-eight patients were included in the study. Median age was 18.5 months and 17/48 episodes (35.4%) occurred in children 12 months old. Serotypes with high-invasive disease potential were identified in 15/48 episodes (31.2%). *MBL2* deficient genotypes accounted for 18.8% (9/48). Children 12 months old had a 7-fold risk (95% CI: 1.6±29.9; p < 0.01) of having a *MBL2* deficient genotype in comparison to those > 12 months old. A sub-analysis of patients by age group revealed significant proportions of carriers of *MBL2* deficient genotypes among those 12 months old with PM caused by opportunistic serotypes (54.5%), admitted to the PICU (Pediatric Intensive Care Unit) (46.7%) and of White ethnicity (35.7%). These proportions were significantly higher than in older children (all p<0.05).

Diseases (REIPI, RD12/0015/0018) (<http://reipi.org/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

Our results suggest that differences in MBL2 genotype in children 12 months old affects susceptibility to PM, and it may have an important role in the episodes caused by non-high invasive disease potential serotypes.

Introduction

Streptococcus pneumoniae remains a serious health problem and a leading cause of life-threatening invasive infection in young children. More than 14 million cases of pneumococcal disease occur annually in children aged < 5 years with a mortality rate over 5% [1]. *S. pneumo-niae* is the main cause of bacterial meningitis in children beyond the neonatal period [1]. The morbidity and case-fatality ratio for pneumococcal meningitis is high. The average global pneu-mococcal meningitis case-fatality ratio has been estimated to be 59%^o [1]. Children are often colonized with *S. pneumoniae* in the nasopharynx. Capsular polysaccharides are the main virulence factors of pneumococci. There are more than 95 different capsular types (serotypes) but not all have the same ability to invade and cause disease. Some *S. pneumo-niae* serotypes are considered to have a low-invasive capacity to cause disease and are often found in carriers. They are common colonizers specially in children < 2 years and have more temporal opportunity for invasion in this age range. They are also called "opportunistic sero-types" [2,3]. In contrast, serotypes with a high-invasive capacity to cause disease are seldom detected in carriers but they are an important cause of invasive disease specially in older chil-dren [4,5]. Serotypes are classified according to the studies of Brueggemann [4] Sleeman [5] and del Amo [6]: 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 18C and 19A are considered to have a high-attack rate or highly-invasive serotypes whereas the remainder are considered as low-attack rate or non-highly-invasive or opportunistic serotypes. These highly-invasive serotypes are generally included in the pneumococcal vaccines (PCV13 or PPSV23). The complex interaction between impaired host immune factors and virulence determi-nants of the pneumococcus plays a role in the development of invasive pneumococcal disease (IPD) [7]. Components of the host innate immune response are important first-line defense factors against infections in young children since the adaptive response is still developing and often altered with reduced antibody response and of shorter persistence [8]. Mannose-binding lectin (MBL) is a proinflammatory protein of the innate immune system involved in comple-ment activation via the lectin pathway and it provides immediate host defense against infection [9]. Current knowledge holds that MBL serum levels largely depend on the *MBL2* genotype [10±12]. MBL has the capacity of activating the complement cascade independent of antibody response [9] and its plasma concentration is genetically determined [13,14]. *S. pneumoniae* shows low to intermediate MBL binding capacity and MBL-deficiency has been associated with a 5-fold increased risk of death due to pneumococcal disease [15]. Evidence supports MBL-deficiency as a risk factor for developing IPD [9], higher risk of developing severe respiratory complications in neonates and young children [16], higher bacterial loads during meningococcal sepsis in young children [17], and increased risk for higher frequency and duration of infectious complications in children with malignancies [18]. However, its role in host defense to pneumococcus remains a matter of debate. It has been consid-ered to predispose to IPD for some authors, while others have discarded it [9,19,20]. The objective of the present study is to evaluate PM susceptibility in pediatric patients con-sidering the major virulence factor of pneumococci, capsular type and the genetic variation

within the *MBL2* gene as an important host immune factor. This information could be useful for designing preventive strategies on children based on previous analysis of host-pathogen interactions.

Materials and methods

Setting, population and design

The Pediatric Pneumococcal Surveillance Study Group based at Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona) has been prospectively collecting epidemiological, clinical and analytical data from children with IPD since 1988. In this retrospective observational study we included patients 18 years of age with community acquired PM from our database between 1 January 2001 and 31 March 2016 (conjugated vaccine era). Children were classified in <12 months of age and >12 months of age. PM was defined as an *S. pneumoniae* positive cerebrospinal fluid (CSF) culture and/or *S. pneumoniae* DNA detection in CSF.

Microbiologic methods

Pneumococcal isolates were identified and serotyped using standard methods in the molecular microbiology department at Hospital Sant Joan de Deu. DNA detection of pneumolysin (*ply*) and *LytA* gene by Real-Time PCR (*polymerase chain reaction*) in CSF was performed according to previously reported assays [21±24].

Serotypes were classified according to published scientific assays [4±6]: 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 18C and 19A were considered as high-attack rate or highly-invasive serotypes whereas the remainder were considered as low-attack rate or non-highly-invasive or opportunistic serotypes.

MBL2 polymorphism analysis

DNA extraction, amplification and genotyping of *MBL2* were carried out as previously described [25]. Six single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5'-flanking/promoter region (-550 G/C -221 C/G, 4 C/T) and the exon 1 (codon 52 CGT/TGT, codon 54 GGC/GAC and codon 57 GGA/GAA) of the *MBL2* gene were analyzed using a PCR and Sequence-Based Typing (SBT) technique. The D, B and C variants at codons 52, 54 and 57, respectively, are major determinants of low serum MBL levels [13]. As previously described by Ali YM et al [20], these variants are collectively named O, while A indicates the wild-type variant at all those codons. The SNPs at positions ±551 [H/L], -221 (X/L) and +4 (P/Q) also influence serum MBL levels in individuals with the wild-type A variant. However, the functional effects of H/L and P/Q SNPs appear to be minor compared to L/X, X being the allele associated with lower MBL expression. Accordingly, MBL serum concentrations can be divided into the following 3 genotype groups: high (A/A, A/XA), intermediate (XA/XA, A/O) and low (XA/O, O/O).

Data collection and exclusion criteria

Clinical information of patients was extracted from medical records and recorded on a standardized case report form that included demographics, clinical presentation, laboratory results, neuroimaging findings, management, complications and neurological sequelae. Children with functional deficit of classical or alternative pathways of complement activation were excluded from the study, as well as patients with immunocompromised conditions (human immunodeficiency virus infection, immunoglobulin deficits), cystic fibrosis, bronchiectasis or cerebrospinal leak.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences Software (IBM SPSS1 22 version). Descriptive statistics was used to characterize the study population. The χ^2 test and Fisher exact test were used to compare categorical variables. Continuous non-normally distributed variables were described in terms of median value with interquartile range (IQR, 25th percentile - 75th percentile) and compared using Mann-Whitney *U* test. Risk associations are presented as relative risk with 95% confidence intervals. A 2-tailed *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Data confidentiality and ethical aspects

All information collected was treated as confidential in strict observance of legislation. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Deu (Permit Number: CEIC PIC 98±13) and conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All subjects and their legal representatives included in the study received detailed information about the aims of the study prior to recruitment. Written informed consent was obtained from all patients/legal representatives.

Results

Characteristics of the study population

A total of 821 IPD episodes occurred during the study period; 104 PM episodes (12.7%) were identified among 93 children (29/93, 27.9% were <12 months). 12/104 episodes (11.5%) were excluded due to exclusion criteria [cerebrospinal leak]; 33/104 episodes (31.7%) refused to participate in the study. 8/104 children (7.7%) died due to the infection. All of the patients who died but one were under 2 years of age. They were mainly male (75%). The pneumococcal strain was serotyped in 5 of the patients (4/5 were opportunistic serotypes). Among those that were serotyped, all but one are included in the 13v pneumococcal vaccine. No MBL genotypes were available for those patients. Thus, the final study sample comprised 48 episodes with PM.

There was a predominance of males (29/48; 60.4%). The predominant ethnic group was White (43/48; 89.6%). Median age was 18.5 months (IQR, 7.2±54.2) and 17/48 episodes (35.4%) occurred in children 12 months old. There was a median LOS of 17 days (IQR, 13±24). In 43/48 episodes (89.6%) admission to the Pediatric Intensive Care Unit (PICU) was required. Only 15/48 patients (31.2%) had previously been completely vaccinated (10 with PCV7 and 5 with PCV13); 31/48 (64.6%) suffered sequelae (such as motor impairment, seizures, psychomotor retardation, hearing loss or loss of vision). [Table 1](#) shows demographic, clinical and microbiological variables of patients according to age category.

Diagnosis and serotyping

Among all episodes, 35.4% (17/48) were confirmed only by PCR, 20.8% (10/48) by culture and 43.8% (21/48) by both PCR and culture. No patient was positive for any other bacteria other than *S.pneumoniae* in CSF or blood cultures or PCR analysis. Capsular serotypes were available for all PM cases. Serotypes 19A, 19F and 3 were the most frequent serotypes and accounted for about 31.2% of the infections (19A, n = 5/48; 19F, n = 5/48 and 3, n = 5/48). Serotypes with high-invasive capacity were identified in 15/48 episodes (31.2%). The currently used PCV13 vaccine would have covered 62.5% of serotypes that caused PM (30 out of 48 episodes). Genotype of *MBL2* gene was available for all 48 patients. Deficient-MBL associated genotypes accounted for 18.8% (9/48). [Table 2](#) provides an overview of haplotype frequencies.

Table 1. Demographic, clinical and microbiological variables of patients according to age category.

| Characteristics | 12 months | >12 months | Total | p-value |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|-----------|-------------|
| Subjects | 17 | 31 | 48 | |
| Male | 12 (70.6) | 17(54.8) | 29 (60.4) | 0.29 |
| White Ethnicity | 14 (82.3) | 29(93.5) | 43 (89.6) | 0.22 |
| PICU admission | 15 (88.2) | 28(90.3) | 43 (89.6) | 0.82 |
| LOS days [IC95%] | 20.8 (15.4±26.1) | 25.2 (9.4±41.2) | | 0.75 |
| Sequelae | 8 (47.1) | 23(74.2) | 31 (64.6) | 0.06 |
| Non-vaccinated according to age | 11 (64.7) | 22(71.0) | 33 (68.8) | 0.65 |
| PM caused by low invasive serotypes | 11 (64.7) | 22(71.0) | 33 (68.7) | 0.65 |
| PCV13 serotypes | 10 (58.8) | 20(64.5) | 30 (62.5) | 0.70 |
| MBL2 de@cient genotypes | 7 (41.2) | 2(6.4) | 9 (18.7) | 0.03 |

PICU, pediatric intensive care unit; LOS, length of stay; PM, pneumococcal meningitis; PCV13, 13-valent pneumococcal vaccine; MBL, mannose-binding-lectin

Signi@cant values in bold numbers

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377.t001>

Median age in patients with *MBL2* deficient genotypes was 8.0 months (IQR 4.0±15.5) compared to 44.5 months (IQR 10.0±67.0) in patients with *MBL2* non-deficient genotypes (p = 0.01). Children 12 months old had a 7-fold risk of having a low-MBL genotype in comparison to those > 12 months old (Relative-Risk = 7.00 (95% CI: 1.6±29.9; p < 0.01). A sub-analysis of patients by age category (considering children's age at the cut-off value of 12 months old) revealed significant proportions of carriers of *MBL2* deficient genotypes among those 12 months old with PM caused by opportunistic serotypes (54.5%, 6/11), admitted to the PICU (46.7%, 7/15) and of white ethnicity (35.7%, 5/14). These proportions were significantly higher than in older children (p < 0.05) (Table 3).

MBL2 deficient genotypes were not found to be significantly associated with sex, ethnicity, serotype invasiveness, PICU admission, vaccination status or clinical course variables. Data regarding associations between variables and *MBL2* genotypes are presented in Table 4.

Discussion

This study highlights the relationship between genetically determined MBL deficiency and the increased risk of pneumococcal meningitis in children younger than 12 months old, especially by serotypes with low invasive capacity or opportunistic serotypes. Susceptibility to IPD is higher in younger children [1,2]. Children under 2 years of age rely on their innate immune response to overcome infections, which is critical to avoid the spread of nasopharyngeal colonizing organisms into sterile human body sites [8]. MBL is a circulating

Table 2. Overview of haplotypes frequencies in children with pneumococcal meningitis.

| Promoter YY | | YX | XX |
|-------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Exon | | | |
| AA | A/A n = 15 (31.3%) | A/XA n = 10 (20.8%) | XA/XA n = 4 (8.3%) |
| AO | A/O n = 10 (20.8%) | XA/O n = 4 (8.3%) | |
| OO | O/O n = 5 (10.4%) | | |

MBL serum concentrations were divided into the following 3 groups: normal (A/A, A/XA), intermediate (XA/ XA, A/O) and de@cient (XA/O, O/O). Mannose-binding-lectin (MBL) protein expression: white: normal; light grey: intermediate; dark grey: defective.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377.t002>

Table 3. Variable frequencies according to age group and MBL2 genotype.

| Variables | Age group 12 months | Patients with MBL2 deficient genotypes | Age group > 12 months | Patients with MBL2 deficient genotypes | p-value* |
|--------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--|------------------|
| | Total number of patients | | Total number of patients | | |
| Serotype invasiveness | | | | | |
| Opportunistic serotype | 11 | 6 (54.5%) | 22 | 1 (4.55%) | < 0.01 |
| High invasiveness | 6 | 1 (16.6%) | 9 | 1 (11.1%) | 0.76 |
| White ethnicity | 14 | 5 (35.7%) | 29 | 2 (6.9%) | 0.02 |
| Clinical course with sequelae | 8 | 3 (37.5%) | 23 | 2 (8.7%) | 0.06 |
| PICU admission | 15 | 7 (46.7%) | 28 | 2 (7.1%) | <0.01 |

Significant values in bold numbers.

MBL, mannose-binding-lectin; PICU, pediatric intensive care unit.

* Proportions between groups were compared using Pearson Chi-square test or Fisher's exact test when appropriate

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377.t003>

protein of the innate immune system and its deficiency has been reported to predispose to IPD

[9]. A previous study of our group suggested that a genetically determined low-MBL production could be associated with IPD when disease occurs in children under 2 years of age [24]. In the present study, we also found a significantly higher proportion of MBL2 deficient genotypes among children 12 months with PM. The frequency of MBL2 deficient genotypes was significantly higher in children 12 months of age in comparison to older patients (41.1% vs 6.2%), whereas the overall MBL2 deficient genotypes prevalence in adults from our setting is around 10±15% [26]. These data suggest that children with MBL2 deficient genotypes are at higher risk of PM in their first year of life. This is in agreement with Brouwer et al report on association of low-producing MBL2 genotypes and increased risk of PM [27].

On the other hand, IPD in children is often caused by serotypes with low invasive disease potential [3], as we report in our series (68.8% of the PM were caused by opportunistic serotypes). Considering only the episodes caused by opportunistic serotypes, we observed that the proportion of individuals with MBL2 deficient genotypes was higher in children 12 months old than in older ones. Nevertheless, this finding was not observed in those children with PM caused by high-invasive disease potential. In our opinion, this suggests that low invasive capacity serotypes may have more opportunities to cause invasive disease in young children with MBL2 deficient genotypes as their immunity relies specifically in the innate immune system. In our previous study, the frequency of MBL2 deficient genotypes was especially high in

Table 4. Variable frequencies according to MBL2 genotype.

| Variables | Patients with MBL2 deficient genotypes | Patients with MBL2 non-deficient genotypes | p value |
|--|--|--|-------------|
| Age [months], IQR | 8.0 (4.0±15.5) | 44.5 (10.0±67.0) | 0.01 |
| Female | 5 (55.6) | 14 (35.9) | 0.27 |
| White ethnicity | 7 (77.8) | 36 (92.3) | 0.19 |
| PICU admission | 9 (100) | 34 (87.2) | 0.25 |
| LOS days (SD) | 26.56 (±24.79) | 20.28 (±13.27) | 0.29 |
| Clinical Course with sequelae | 5 (55.6) | 26 (66.7) | 0.53 |
| Non-high invasiveness / opportunistic serotype | 7 (77.8) | 26 (66.7) | 0.51 |

Data are presented as n (%). IQR (interquartile range)

Significant values in bold numbers

PICU, pediatric intensive care unit; LOS, length of stay; SD, standard deviation

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377.t004>

younger children with IPD caused by opportunistic serotypes too [24]. At this point, it is important to underline that 13-valent conjugated vaccine would have protected against the main serotypes causing PM in our series, achieving protective antibody titers with prompt vaccination schedules [28].

A potential limitation in this study could be the assumption that patients were healthy prior to meningitis. Some of the children might have unidentified immunodeficiency or other chronic diseases that had not been diagnosed at the time of meningitis. However we have tried to lower this bias through the exclusion criteria and long follow-up. Secondly, the role of other protein receptors such as ficolins, pentraxins or salivary agglutinin/gp340/DMBT1 known to be involved in the innate immune system response to *S. pneumoniae* has not been studied [29]. Third, we did not analyze other factors that may be involved in the set from colonization to disease and, in particular, the role of co-infection with respiratory viruses [30,31]. Fourth, if the sample size was larger the difference between the conditions compared could be measured with greater confidence. However, this is harder to achieve in pediatric studies. In conclusion, the importance of MBL in susceptibility to infection is largely discussed and remains controversial [9,19,20,32], but our results suggest that genetic variation in the *MBL2* gene could affect the susceptibility to PM in children 12 months old, and it may have a more important role in the episodes caused by non-high invasive disease potential serotypes. This association suggests that the risk of IPD cannot only be assessed by clinical, epidemiological or microbiological factors but also by the immune characteristics of the youngest hosts. In this regard, the conceptual framework known as PIRO (predisposition, infection characteristics, host response and organ dysfunction) [33] could be a tool not only for understanding the pathophysiology of meningitis but also for helping to better the prognosis and be able to design appropriate interventions and evaluate the impact that they represent. We believe that knowing what factors are most important for morbidity and mortality in our patients may help to stratify risk and improve the use of health resources. Children with the risk factors noted above may be more aggressively monitored and treated and preventive strategies, such as early vaccination, strongly recommended.

Supporting information

S1 Table. Supporting data for the manuscript results.
(XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank Dr Marta Consuegra-Fernandez for her assistance with statistical analysis.

Author Contributions

Conceptualization: CB CL IJ MA MTA FL JJG CMA.

Data curation: CB CL IJ MA CMA.

Formal analysis: CB CL IJ CMA.

Funding acquisition: CMA.

Investigation: CB CL MA CMA.

Methodology: CB CL IJ MA MTA FL JJG CMA.

Project administration: CL CMA.

Resources: CB CL MA CMA.

Supervision: CL CMA.

Validation: CL IJ MTA FL JJG CMA.

Visualization: CB CL CMA.

Writing ± original draft: CB CL IJ CMA.

Writing ± review & editing: CB CL IJ MA MTA FL JJG CMA.

References

- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet. England*; 2009 Sep; 374(9693):893±902. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61204-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61204-6) PMID: [19748398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19748398/)
- Munoz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C, Marco F, Navarro M, Bartolome R, et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect. England*; 2011 Aug; 63(2):151±62. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.06.002> PMID: [21679725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21679725/)
- 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. Netherlands*; 2010 Dec; 29(2):283±8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.032> PMID: [21029807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21029807/)
- Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis. United States*; 2003 May; 187(9):1424±32. <https://doi.org/10.1086/374624> PMID: [12717624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12717624/)
- Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis. United States*; 2006 Sep; 194(5):682±8. <https://doi.org/10.1086/505710> PMID: [16897668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16897668/)
- del Amo E, Brotons P, Monsonis M, Trivino M, Inigo M, Selva L, et al. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect. France*; 2014 Jul; 20(7):684±9. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12422> PMID: [24467648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24467648/)
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis. United States*; 2004 Mar; 4(3):144±54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7) PMID: [14998500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14998500/)
- Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. *J Infect. England*; 2015 Jun; 71 Suppl 1: S112±20.
- Roy S, Knox K, Segal S, Griffiths D, Moore CE, Welsh KI, et al. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet. England*; 2002 May; 359(9317):1569±73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08516-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08516-1) PMID: [12047967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12047967/)
- Ip WKE, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev. England*; 2009 Jul; 230(1):9±21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x> PMID: [19594626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19594626/)
- Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol. England*; 2002 Dec; 56(6):630±41. PMID: [12472676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12472676/)
- Garred P, Thiel S, Madsen HO, Ryder LP, Jensenius JC, Svejgaard A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. *Clin Exp Immunol. England*; 1992 Dec; 90(3):517±21. PMID: [1458688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1458688/)
- Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol. UNITED STATES*; 1995 Sep; 155(6):3013±20. PMID: [7673719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7673719/)
- Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet. Sweden*; 2000; 2(3):305±22. PMID: [11256742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11256742/)
- Eisen DP, Dean MM, Boermeester MA, Fidler KJ, Gordon AC, Kronborg G, et al. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin Infect Dis. United States*; 2008 Aug; 47(4):510±6. <https://doi.org/10.1086/590006> PMID: [18611155](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18611155/)
- Speletas M, Gounaris A, Sevdali E, Kompoti M, Konstantinidi K, Sokou R, et al. MBL2 genotypes and their associations with MBL levels and NICU morbidity in a cohort of Greek neonates. *J Immunol Res. Egypt*; 2015; 2015:478412. <https://doi.org/10.1155/2015/478412> PMID: [25879044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879044/)

19. Darton TC, Jack DL, Johnson M, Borrow R, Guiver M, Kaczmarek EB, et al. *MBL2* deficiency is associated with higher genomic bacterial loads during meningococemia in young children. *Clin Microbiol Infect.* England; 2014 Dec; 20(12):1337±42. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12745> PMID: [24977653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24977653/)
20. Dommert R, Chisholm J, Turner M, Bajaj-Elliott M, Klein NJ. Mannose-binding lectin genotype influences frequency and duration of infectious complications in children with malignancy. *J Pediatr Hematol Oncol.* United States; 2013 Jan; 35(1):69±75. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e31827076e5> PMID: [23073041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23073041/)
21. Kronborg G, Weis N, Madsen HO, Pedersen SS, Wejse C, Nielsen H, et al. Variant mannose-binding lectin alleles are not associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in randomly included patients. *J Infect Dis.* United States; 2002 May; 185(10):1517±20. <https://doi.org/10.1086/340216> PMID: [11992290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11992290/)
22. Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* United States; 2012; 8(7):e1002793. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002793> PMID: [22792067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22792067/)
23. Selva L, del Amo E, Brotons P, Munoz-Almagro C. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol.* United States; 2012 Nov; 50(11):3451±7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-12> PMID: [22875895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22875895/)
24. Tarrago D, Fenoll A, Sanchez-Tatay D, Arroyo LA, Munoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* France; 2008 Sep; 14(9):828±34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x> PMID: [18844683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18844683/)
25. del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, Trivino M, et al. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Germany; 2015 Apr; 34(4):705±11. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2280-y> PMID: [25413925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25413925/)
26. Munoz-Almagro C, Bautista C, Arias MT, Boixeda R, Del Amo E, Borrás C, et al. High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in young children with invasive pneumococcal disease. *Clin Microbiol Infect.* England; 2014 Oct; 20(10):O745±52. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12615> PMID: [24602163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24602163/)
27. Cervera C, Balderramo D, Suarez B, Prieto J, Fuster F, Linares L, et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* United States; 2009 Oct; 15(10):1217±24.
28. Smithson A, Perello R, Aibar J, Espinosa G, Tassies D, Freire C, et al. Genotypes coding for low serum levels of mannose-binding lectin are underrepresented among individuals suffering from noninfectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Vaccine Immunol.* United States; 2010 Mar; 17(3):447±53. <https://doi.org/10.1128/CVI.00375-09> PMID: [20042521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20042521/)
29. Brouwer MC, Baas F, van der Ende A, van de Beek D. Genetic variation and cerebrospinal fluid levels of mannose binding lectin in pneumococcal meningitis patients. *PLoS One.* United States; 2013; 8(5): e65151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065151> PMID: [23741476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23741476/)
30. Deloria Knoll M, Park DE, Johnson TS, Chandir S, Nonyane BAS, Conklin L, et al. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on immunogenicity. *Pediatr Infect Dis J.* United States; 2014 Jan; 33 Suppl 2:S119±29.
31. Palaniyar N. Antibody equivalent molecules of the innate immune system: parallels between innate and adaptive immune proteins. Vol. 16, *Innate immunity.* United States; 2010. p. 131±7. <https://doi.org/10.1177/1753425910370498> PMID: [20529970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20529970/)
32. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.* United States; 2013 Jan; 9(1):e1003057. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003057> PMID: [23326226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23326226/)
33. Launes C, Garcia-Garcia J-J, Trivino M, Peris N, Pallares R, Munoz-Almagro C. Respiratory viruses, such as 2009 H1N1 influenza virus, could trigger temporal trends in serotypes causing pneumococcal disease. *Clin Microbiol Infect.* England; 2014 Dec; 20(12):O1088±90. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12744> PMID: [24977322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24977322/)
34. Garcia-Laorden MI, Rodriguez de Castro F, Sole-Violan J, Payeras A, Briones ML, Borderias L, et al. The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *Eur Respir J.* Switzerland; 2013 Jan; 41(1):131±9. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174111> PMID: [22523362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22523362/)
35. Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* United States; 2005 May; 6(3 Suppl):S55±60.

Resum del segon article:

Es tracta d'un estudi observacional retrospectiu on s'inclouen tots els pacients menors de 18 anys diagnosticats de meningitis pneumocòccica adquirida en la comunitat a l'Hospital Sant Joan de Déu en el període comprès entre l'1 de gener de 2001 i el 31 de març de 2016 (període de comercialització de les vacunes conjugades antipneumocòcciques). Es van recollir dades demogràfiques i variables clíniques incloent edat, sexe, ètnia, factors de risc per a MPI i estat de vacunació. També es van recollir dades referents a forma clínica de presentació, evolució de la infecció i seqüeles, troballes de neuroimatge, ingrés a unitat de cures intensives i temps d'estada hospitalària. Es va realitzar la prova de detecció del pneumococ en líquid cefaloraquidi mitjançant cultiu i/o detecció d'ADN específic. Tots els pneumococ es van serotipar mitjançant tècniques de microbiologia molecular i/o Quellung. Es va determinar el genotip de *MBL2* en tots els pacients inclosos. Es van excloure tots aquells pacients amb dèficit congènit o adquirit del complement així com patologies que cursen amb immunosupressió (infecció per VIH, dèficits d'immunoglobulines), fibrosi quística, bronquièctasis o fístules de líquid cefaloraquidi.

Els resultats d'aquest segon estudi són:

1. Característiques epidemiològiques:

- 1.1. Durant el període d'estudi es diagnostiquen 821 episodis de MPI dels quals 104 (12.7%) corresponen a meningitis pneumocòccica, identificada en 93 nens

(29/93, 27.9% foren menors de 12 mesos). La resta són episodis recurrents en els mateixos nens.

1.2. Es van excloure 12/104 episodis (11.5%) per criteris d'exclusió (fístules de líquid cefaloraquídi). 33/104 (31.7%) van rebutjar participar en l'estudi.

1.3. 8/104 (7.7%) van morir a conseqüència de la infecció. Tots els pacients èxits, excepte un, eren menors de 2 anys i el 75% eren homes. La majoria dels serotips causants de la infecció en aquest grup de pacients eren oportunistes.

1.4. Es van incloure finalment un total de 48 episodis a l'estudi. El 60.4% (n=29) eren homes i el 89.6% (n=43) eren d'ètnia caucàsica. L'edat mitjana fou de 18.5 mesos (RIQ 7.2-54.2). El 35.4% dels episodis va ocórrer en menors de 12 mesos. El 64.6% dels pacients (n=31) va presentar seqüeles a causa de la infecció (dèficit motor, convulsions, retràs psicomotor, pèrdua d'audició o visió).

1.5. Només el 31.2% dels pacients inclosos (n=15) havien rebut vacunació antipneumocòccica (10 amb PCV7 i 5 amb PCV13).

1.6. El 64.6% dels nens (31/48) van presentar seqüeles tals com alteracions motores, convulsions, retard psicomotor, pèrdua d'audició o visió.

2. Perfil microbiològic i immunològic

2.1. El 35.4% (n=17) dels episodis es va confirmar mitjançant PCR, el 20.8% (n=10) es va confirmar amb cultius i el 43.8% restant (n=21) amb ambdós mètodes. No es van detectar coinfeccions bacterianes.

2.2. Els serotips més freqüents foren el 19A, el 19F i el 3. Representen tots ells el 31.2% de les infeccions.

2.3. El 62.5% dels casos de meningitis pneumocòccica fou causat per serotips inclosos en la vacuna conjugada 13-valent.

2.4. El 31.2% dels casos (n=15) fou causat per serotips amb alt potencial invasiu.

2.5. El 18.8% dels pacients (n=9) tenien un genotip *MBL2* associat a dèficit sèric de MBL.

3. Relació clínica, microbiologia i immunologia

3.1. Els nens menors de 12 mesos tenen un risc relatiu 7 vegades major de tenir un genotip *MBL2* associat a dèficit sèric de MBL en comparació als majors de 12 mesos (RR 7.00, 95% CI:1.6-29.9; p<0.01).

3.2. S'observen proporcions significatives de portadors de genotips *MBL2* associats a dèficit sèric de MBL en els menors de 12 mesos amb meningitis causada per serotips oportunistes (54.5% vs 4.55%), ètnia caucàsica (35.7% vs 5.9%) i admesos a la unitat de cures intensives (46.7% vs 7.1%) en relació als majors de 12 mesos.

5. DISCUSSIÓ

5. Discussió

5.1. Epidemiologia.

La susceptibilitat a la MPI s'ha relacionat amb l'edat i, de forma especial, els primers anys de vida són un dels períodes amb major risc per desenvolupar la malaltia (26,79).

La major incidència de MPI té lloc durant els primers anys de vida amb un pic d'incidència entre els 6 i 11 mesos d'edat (78). La incidència de MPI és especialment elevada en nens menors de 2 anys. En els ambdós estudis que componen aquesta tesi es confirma aquesta prevalença. En el primer estudi observem que el 69.4% de casos MPI ocorre en edat pediàtrica amb una edat mitjana de 2.9 anys (RIQ 1.7-5.3 anys). En el segon estudi observem que el 27.9% de casos de meningitis pneumocòccica ocorre en menors de 12 mesos.

En la majoria d'estudis publicats la MPI és més prevalent en nens que en nenes. En el primer estudi observem que el 57.8% de casos de MPI va ocórrer en nens. El 75% de casos de meningitis pneumocòccica va ocórrer en pacients de sexe masculí.

5.1.1. Impacte de la vacunació antipneumocòccica

La introducció de la vacunació antipneumocòccica ha tingut un impacte directe en la epidemiologia i la morbimortalitat causada per la MPI i també ha provocat un recanvi en els serotips causants de malaltia. No obstant en el nostre medi, l'impacte de la vacunació antipneumocòccica ha estat diferent als Estats Units ja que aquesta no ha

estat universal. La vacunació antipneumocòccica PCV7 es va introduir a Espanya l'any 2001 i PCV10 i PCV13 al 2009. La vacunació antipneumocòccica no fou subvencionada de forma pública a Catalunya fins als juliol de 2016 (a excepció dels grups de risc). Aquest fet provoca una elevada variabilitat en les cobertures vacunals ja que depèn del poder adquisitiu dels pares (la vacuna no rep finançament públic), de la indicació del pediatre i de l'acceptació de la vacunació per part dels pares. S'estima que la cobertura vacunal antipneumocòccica a la nostra àrea geogràfica es situava entre el 30 i 50% abans del 2010 (95), i al voltant del 64% en els menors de 2 anys en el període 2011-2015 (96). En els dos estudis que componen aquesta tesi les taxes de vacunació antipneumocòccica han estat baixes en els pacients diagnosticats de MPI: 30.6% en el primer i 31.2% en el segon.

Això es reflecteix en el perfil de serotips causants de malaltia en els nostres estudis. Malgrat que a Catalunya hi ha hagut una reducció significativa de la MPI causada per serotips inclosos a PCV7 inicialment i PCV10 i PCV13 posteriorment i un augment proporcional de la MPI per serotips no vacunals (99–101,104,105,118), la MPI causada per serotips vacunals continua essent important probablement a causa de cobertures vacunals baixes. En el primer estudi, el 72.5% dels casos fou secundari a serotips inclosos en la vacunació 13 valent, especialment en els menors de 2 anys on aquesta xifra s'eleva fins al 75.9%. Els serotips més freqüents aïllats en aquest estudi foren l'1, el 3, el 7F i el 19A. En el segon estudi, el 62.5% dels casos de meningitis pneumocòccica fou causat per serotips vacunals i els serotips més freqüents foren 3, 19A i 19F.

Aquest recanvi de serotips induït per la vacunació ha estat publicat en la literatura on s'observen diferències entre els Estats Units i Europa. Als Estats Units s'estima que la MPI causada per serotips no vacunals abans de la introducció de la PCV7 representava

el 17% del total de casos en comparació al 88% després de la introducció de la vacunació. Després de la introducció de PCV7, els principals serotips no vacunals causants de MPI als Estats Units foren 3, 7F i 19A que englobaven el 95% de casos de MPI (78). A Catalunya els principals serotips no vacunals causants de MPI foren 19A i 1 (104,105). La proporció de serotips no vacunals causants de MPI a Catalunya s'estimava de 68.4% al 2007 (100) i 87% al 2009 (101).

Amb la introducció de PCV10 i PCV13 a Catalunya es va observar un descens global de MPI causada per serotips vacunals de PCV13, especialment de serotips 19A i 7F. Aquest descens no es va observar en els serotips 3 i 14 (96,106) que continuen essent prevalents. La situació epidemiològica és diferent als Estats Units on la introducció de PCV13 es relaciona amb un descens global en la incidència de MPI i especialment d'aquella causada per serotips vacunals de PCV13. Actualment els principals serotips causants de MPI als Estats Units en els menors de 5 anys són 22F (11%), 33F (10%), 38 (9%) i 35B (8%). A més, no s'ha identificat un augment significatiu de la incidència de MPI causada per serotips no vacunals en els menors de 5 anys (88,89).

La introducció de la vacunació en l'edat pediàtrica també ha tingut un impacte en la morbimortalitat de la MPI. Aquest fet podria estar relacionat amb el perfil d'invasivitat de les soques de pneumococ causant de malaltia. Les soques considerades d'alt potencial invasiu s'associen habitualment a patologia de curs més benigne i són les que estan incloses en la vacunació 13 valent. Les soques de baix potencial invasiu s'associen a patologia més agressiva i amb major mortalitat. Els estudis que componen aquesta tesi no tenen per objectiu avaluar l'impacte vacunal en la morbimortalitat associada a MPI. No obstant, sí mostren el fet que formes de MPI de curs clínic més

agressiu, com la meningitis pneumocòccica, presenten proporcions més elevades de serotips de baix potencial invasiu.

5.2. Factors de risc per desenvolupar MPI

La *American Academy of Pediatrics (AAP)* i el *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* han definit els factors de risc altament associats a MPI (57,58) i amb forta evidència a la literatura: factors demogràfics (menors de 2 anys o majors de 65 anys), factors immunològics (asplènia o hiposplènia, defectes de la immunitat humoral: complement o immunoglobulines), malalties cròniques (diabetis mellitus, infecció per VIH), factors infecciosos (antecedent d'infecció per *influenza*, colonització recent per soca virulent) i alcoholisme. Existeixen altres factors probablement associats a MPI (sexe masculí, raça negra o nadius d'Alaska, polimorfismes genètics, pobresa, tabaquisme, malaltia pulmonar o hepàtica crònica) i possiblement associats a MPI (exposició recent a antibiòtics, defectes de la immunitat cel·lular o dels neutròfils, reflex tussigen disminuït, assistència a guarderia) que s'han comentat prèviament a la introducció. La *Asociación Española de Pediatría* enumera també els factors de risc basant-se en l'AAP i el CDC i els classifica de la següent manera: defectes no immunològics (fractura base del crani, fístula LCR, implants coclears, insuficiència cardíaca, síndrome nefròtica), defectes de fagocitosi (neutropènia, asplènia), defectes del sistema immunològic (immunodeficiència primària o secundària, defectes del complement) i malalties cròniques (neoplàsies, cirrosis, diabetis mellitus, alcoholisme, insuficiència renal) (76,77).

En el nostre estudi, per tal de reduir l'impacte d'aquests factors de risc coneguts, especialment la presència de patologia mèdica crònica, es van establir els criteris d'exclusió prèviament comentats. Ja hem comentat en l'apartat epidemiològic que la MPI és més freqüent en edat pediàtrica, especialment en els menors de dos anys, així com també en el sexe masculí. Les troballes es corresponen amb els resultats d'ambdós estudis d'aquesta tesi.

El risc de MPI també s'ha relacionat amb la presència d'infeccions respiratòries virals, especialment pel virus de la grip. Les infeccions virals augmenten l'expressió en la superfície de les cèl·lules epitelials de l'aparell respiratori de receptors de pneumococ que poden facilitar la invasió (74,75). No s'ha estudiat en cap dels estudis d'aquesta tesi la coinfecció viral. No obstant, es tracta d'una hipòtesi etiopatològica molt interessant per desenvolupar en el futur.

5.3 Invasivitat del pneumococ i formes clíniques de MPI

Tal i com hem comentat anteriorment en aquesta tesi, el pneumococ pot colonitzar la via aèria dels pacients. Aquest fet és especialment típic en nens, sobretot en els menors de 5 anys on les taxes de colonització poden arribar al 75% i disminueixen amb l'edat situant-se en el 25% en els adolescents i al voltant del 5% en els adults (7,8). Les soques de pneumococ poden colonitzar la via respiratòria sense provocar cap altre efecte i la duració de la colonització és generalment específica del serotip (10). Tal com s'ha comentat prèviament, existeix un grup de pneumococs amb alta capacitat invasiva i generalment responsables de patologia clínica menys severa i un altre grup que

desenvolupa una colonització persistent però amb baixa capacitat per la invasió dels teixits però responsables de quadres clínics greus.

En els articles de la nostra tesi es pot observar que els serotips predominants en el primer article són aquells amb alt potencial invasiu (1, 19A i 7F), responsables de pneumònies i bacterièmies (que són els diagnòstics més freqüents). En el segon article s'observa que els serotips més freqüentment responsables de meningitis bacteriana són 3, 19A i 19F. Els dos períodes no són comparables ja que el primer article estudia tres anys concrets dins l'era vacunal mentre que el segon article inclou un període prevacunal.

No obstant, existeixen articles que analitzen l'associació entre mortalitat, manifestacions clíniques i evolució de la infecció causada per serotips d'alt potencial invasiu en contraposició als oportunistes. Les conclusions mostren que els factors propis de l'hoste són millors predictors de morbimortalitat en la MPI que l'invasivitat associada al serotip (32). Així, el risc que un serotip oportunista causi malaltia i/o cursi amb pitjor evolució/seqüeles es relaciona amb més evidència amb una resposta immunològica de l'hoste alterada que amb factors patogènics propis de la soca.

5.4 Genotips MBL2 associats a dèficit sèric de MBL i malaltia pneumocòccica invasiva

El sistema immunològic innat actua com una primera barrera defensiva que és crítica per evitar el pas dels colonitzadors de la nasofaringe cap al torrent circulatori i els líquids estèrils abans que s'iniciï la resposta limfocitària i d'anticossos específics (182).

La resposta immunitària innata és extremadament important durant la primera infància ja que la resposta adaptativa encara es troba en procés de desenvolupament i

maduració i la creació d'anticossos sol ser reduïda i de curta duració (47). Per tots aquests motius, la lluita contra les infeccions en els primers anys de vida depèn en gran part del sistema immunològic innat.

Dins de les troballes del primer estudi, destaca que els menors de 2 anys amb MPI presenten una proporció significativament major de genotips associats a dèficit de *MBL*. A més a més, la freqüència d'aquests genotips fou especialment alta (46.2%) en infants amb MPI causada per serotips oportunistes. Aquests resultats suggereixen que els pneumococs colonitzadors de la nasofaringe tenen més possibilitat de provocar malaltia invasiva en infants amb dèficit genètic de *MBL*. En canvi, en els casos que la MPI fou causada per serotips d'alt potencial invasiu, no es detecta una proporció major de portadors de genotips associats a dèficit de *MBL* en els menors de 2 anys en comparació amb altres grups d'edat. Els serotips amb alt potencial invasiu no solen ser colonitzadors de la nasofaringe i els seus factors de virulència s'han associat a la producció de pleuropneumònia o altres manifestacions clíniques de MPI (183). Aquests resultats suggereixen que els factors microbiològics juguen un paper important en la MPI per serotips d'alt potencial invasiu, independentment de la qualitat de la resposta immunològica, i en contraposició al que ocorre amb la MPI per serotips oportunistes.

Les nostres troballes relacionen el dèficit de *MBL* amb el risc de MPI en els nens menors de 2 anys. Els resultats són semblants als estudis realitzats en ratolins amb aquesta mateixa hipòtesi (184). A més a més, existeixen més estudis que relacionen el dèficit de *MBL* amb altres malalties infeccioses pediàtriques. S'han publicat estudis que relacionen un pitjor curs clínic de la infecció pel VIH en menors de 2 anys amb el dèficit de *MBL* (185), major freqüència i duració de les complicacions infeccioses en nens amb processos oncològics (174) o el risc d'insuficiència respiratòria en nens de 6 a 17 mesos

de vida amb processos infecciosos (186). No obstant, també s'han publicat estudis que mostren un major dèficit genètic de MBL en poblacions de prematurs (187) o d'adults de la nostra zona geogràfica (164) sense que això comporti un major nombre de processos infecciosos.

5.4.1 Genotips MBL2 associats a dèficit sèric de MBL i meningitis pneumocòccica

El segon estudi posa de manifest la relació entre el dèficit de MBL determinat genèticament i el major risc de meningitis pneumocòccica en els nens menors de 12 mesos, especialment per serotips de baix potencial invasiu o oportunistes.

Prèviament, en el primer estudi s'observa que els nens amb meningitis pneumocòccica presenten una proporció major de genotips associats a dèficit de *MBL* (42.9%) en comparació amb nens majors. Aquests resultats estan en consonància amb altres estudis que mostren una associació entre dèficit de *MBL* i major risc de meningitis pneumocòccica (188). D'aquest punt sorgeix la hipòtesi que el dèficit de *MBL* es pot relacionar amb una pitjor evolució clínica i es dissenya un segon estudi per avaluar la relació entre els genotips associats a dèficit de *MBL* i la meningitis pneumocòccica en infants. El segon estudi conclou que la proporció de portadors de genotips associats a dèficit de *MBL* fou significativament major en els menors de 12 mesos amb MP en comparació amb nens majors (41.1% vs 6.2%), mentre que la prevalença global de dèficit de *MBL* en els adults del nostre entorn se situa al voltant del 10-15% (179). Aquests resultats suggereixen que els nens amb dèficit de *MBL* determinat genèticament tenen més risc de patir meningitis pneumocòccica en el seu primer any de vida. Aquests resultats concorden amb el que publica Brouwer (Països Baixos), que

conclou que existeix una associació entre el genotips associats a dèficit de *MBL* i el risc de meningitis pneumocòccica (188).

Tal i com es menciona prèviament, la MPI en la infància sovint és causada per serotips amb baix potencial invasiu (3). En el segon estudi observem que el 68.8% de les MP foren causades per serotips oportunistes. Concretament, si considerem únicament els episodis causats per serotips oportunistes, observem que la proporció d'individus amb genotips associats a dèficit de *MBL* és significativament major en nens ≤ 12 mesos en comparació amb nens majors. Contràriament, aquesta troballa no s'observa en aquells casos de MP causada per serotips d'alt potencial invasiu. Aquest fet suggereix, en línia amb les troballes del primer article, que els serotips de pneumococ que colonitzen la nasofaringe podrien tenir més oportunitats de provocar malaltia invasiva en infants amb genotips associats a dèficit de *MBL* ja que la seva resposta immunològica depèn específicament del sistema immunològic innat. En el primer article, la freqüència de genotips associats a dèficit de *MBL* també fou especialment elevada en infants amb MPI causada per serotips oportunistes. Cal remarcar que la vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent hauria de protegir contra la majoria de serotips causants de MP de la nostra sèrie si s'adquireixen nivells adequats d'anticossos mitjançant pautes de vacunació ajustades (81).

5.5 Limitacions

La capacitat de la *MBL* d'unir-se al pneumococ o altres bacteries capsulades és controvertida ja que hi ha estudis que mostren que aquesta capacitat és baixa (167).

Per tant, podria ser que existissin altres mecanismes d'opsonofagocitosis mediada per

complement i destrucció del pneumococ independents de *MBL* que no han estat avaluats en els nostres estudis. No obstant, existeix evidència d'interacció directa de la *MBL* amb les cèl·lules fagocítiques i del seu paper com a immunomodulador (189,190).

Els resultats d'ambdós estudis han de ser valorats tenint en compte una sèrie de limitacions:

1. Malgrat que la mostra d'estudi ha permès obtenir resultats estadísticament significatius, és necessari realitzar una confirmació dels resultats amb una població més extensa.
2. En el segon estudi es dona per suposat que els pacients eren sans prèviament a l'episodi de meningitis. Alguns d'aquests nens podrien tenir immunodeficiències o altres malalties cròniques encara no identificades o diagnosticades en el moment de la meningitis. No obstant, s'ha intentat disminuir aquest biaix mitjançant els criteris d'exclusió i el seguiment a llarg termini dels pacients inclosos a l'estudi.
3. Cap dels dos estudis exclou la contribució en la barrera defensiva contra el pneumococ d'altres proteïnes que formen part del sistema immunològic innat tals com les ficolines (191), les pentraxines (192) o l'aglutinina gp340/DMBTI (193).
4. En aquests estudis no s'han analitzat altres factors que podrien estar implicats en el pas des de l'estat de colonització cap a la malaltia invasiva i, en particular, el paper de la coinfecció amb virus respiratoris (194,195). Les infeccions virals són molt freqüents en l'edat pediàtrica i existeix evidència que la infecció viral provoca danys a la mucosa que faciliten l'expressió per part del patògen de determinats factors de virulència que faciliten l'adhesió i replicació del virus (194). És necessari realitzar estudis específics que analitzin la relació entre el dèficit d'immunitat

innata i la co-infecció amb virus respiratoris i el risc de MPI. Aquesta hipòtesi s'està actualment desenvolupant com a línia d'investigació al nostre grup de recerca.

5. Tal i com s'ha comentat a la introducció, actualment està en discussió l'existència de factors no genètics que poden afectar els nivells de MBL. Entre aquests hi ha l'edat, l'estat hormonal i l'activació del sistema immunològic. En el nostre estudi això no ha suposat una limitació ja que s'ha aconseguit una població homogènia per edat i s'han determinat criteris d'exclusió per a reclutar individus sans.

5.6 Comentaris

Tal i com s'esmenta en l'apartat de resultats dels articles que componen aquesta tesi, crida l'atenció les baixes xifres de vacunació antipneumocòccica trobades en ambdós estudis. En el cas del primer estudi, només el 30.6% dels pacients amb MPI havien estat prèviament vacunats. Pel que fa al segon estudi, només el 31.2 % dels nens amb meningitis pneumocòccica havia estat prèviament vacunats. Cal remarcar que la vacuna antipneumocòccica 13-valent hauria protegit al 72.5% dels nens amb MPI en el cas del primer estudi i al 62.5% dels nens amb meningitis del segon estudi. Tot i ésser una vacuna recomanada per la *Asociación Española de Pediatría* (196), la seva administració no era gratuïta en el nostre entorn durant el període d'estudi. Aquest fet és especialment remarcable tenint en compte que la infecció pneumocòccica és la infecció bacteriana més freqüent del nostre entorn en pediatria i està associada a una elevada morbimortalitat així com també té un impacte molt important en l'ús de recursos del sistema sanitari. La vacunació antipneumocòccica esdevé una de les estratègies més importants en salut pública orientada a disminuir la morbimortalitat

associada a aquesta patologia. De la mateixa manera, la identificació de grups de risc (tals com nens amb determinades patologies cròniques o estats d'immunosupressió primària o secundària), característiques de la infecció (infecció causada per pneumococs amb baix potencial invasiu) o resposta de l'hoste deficient (alteració en l'activació del complement per dèficit de MBL) permet identificar aquells pacients que es poden beneficiar d'estratègies de prevenció o un maneig més agressiu durant l'episodi agut (197–201). Totes aquestes estratègies no només permeten entendre la fisiopatologia de la malaltia pneumocòccica invasiva sinó que també ajuden a millorar-ne el pronòstic (202,203), dissenyar intervencions apropiades i avaluar l'impacte que provoquen.

6. CONCLUSIONS

6. Conclusions

1. El perfil del pacient ingressat amb malaltia pneumocòccica invasiva fou el d'un nen menor de 5 anys, de sexe masculí i no vacunat.
2. La forma de presentació clínica de MPI més freqüent en tots els rangs d'edat fou la pneumònia complicada. Proporcionalment, la meningitis pneumocòccica fou més prevalent en els menors de 2 anys (24.1% del total de casos de MPI en aquest grup d'edat vs prevalences menors al 12% en altres grups d'edat). El 17% dels pacients va requerir ingrés a UCIP, essent més freqüent en els menors de 2 anys (35.7%) respecte a altres grups d'edat. El 10.2% dels pacients amb MPI va presentar seqüeles a causa de la infecció però aquestes foren més freqüents en el grup de menors de 2 anys (37.5%).
3. La causa més freqüent de MPI foren serotips vacunals inclosos a PVC13 en tots els grups d'edat excepte en els majors de 65 anys. La majoria de casos de MPI fou causada per serotips oportunistes.
4. La prevalença global de genotips responsables de nivells baixos de *MBL* sèrica en pacients amb MPI fou del 15.6%. El dèficit de *MBL* determinat genèticament és significativament més freqüent en els menors de 2 anys (31.0%) i s'associa significament a MPI causada per serotips oportunistes, formes clíniques de meningitis i necessitat d'ingrés a UCIP.
5. El perfil del pacient pediàtric amb meningitis pneumocòccica és el d'un nen menor de 12 mesos, de sexe masculí, no vacunat i amb dèficit genètic de *MBL*.

6. La majoria de pacients pediàtrics amb meningitis pneumocòccica va requerir ingrés a la UCIP independentment de l'edat. La majoria de pacients pediàtrics amb diagnòstic de meningitis pneumocòccica ha presentat seqüeles a causa de la infecció.
7. La causa més freqüent de meningitis pneumocòccica foren serotips vacunals inclosos a PVC13. La majoria de casos de meningitis pneumocòccica fou causat per serotips oportunistes.
8. El dèficit de *MBL* determinat genèticament és significativament més freqüent en els menors de 12 mesos i s'associa significativament en aquest grup d'edat a meningitis pneumocòccica causada per serotips oportunistes i necessitat d'ingrés a UCIP.

7. BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia

1. WHO | Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2008 [Internet]. WHO. World Health Organization; 2013 [cited 2017 Aug 25]. Available from:
http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/
2. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. United States; 2004 Mar;4(3):144–54.
3. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med*. United States; 2005 Jan;352(1):39–47.
4. Weinberger DM, Dagan R, Givon-Lavi N, Regev-Yochay G, Malley R, Lipsitch M. Epidemiologic evidence for serotype-specific acquired immunity to pneumococcal carriage. *J Infect Dis*. United States; 2008 Jun;197(11):1511–8.
5. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. England; 2008 Apr;6(4):288–301.
6. Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis*. United States; 2004 Nov;190(9):1661–9.
7. Devine VT, Jefferies JM, Clarke SC, Faust SN. Nasopharyngeal Bacterial Carriage

- in the Conjugate Vaccine Era with a Focus on Pneumococci. *J Immunol Res. Egypt*; 2015;2015:394368.
8. Devine VT, Cleary DW, Jefferies JMC, Anderson R, Morris DE, Tuck AC, et al. The rise and fall of pneumococcal serotypes carried in the PCV era. *Vaccine. Netherlands*; 2017 Mar;35(9):1293–8.
 9. Hare KM, Morris P, Smith-Vaughan H, Leach AJ. Random colony selection versus colony morphology for detection of multiple pneumococcal serotypes in nasopharyngeal swabs. *Pediatr Infect Dis J. United States*; 2008 Feb;27(2):178–80.
 10. Smith T, Lehmann D, Montgomery J, Gratten M, Riley ID, Alpers MP. Acquisition and invasiveness of different serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Epidemiol Infect. England*; 1993 Aug;111(1):27–39.
 11. Obert C, Sublett J, Kaushal D, Hinojosa E, Barton T, Tuomanen EI, et al. Identification of a Candidate *Streptococcus pneumoniae* core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. *Infect Immun. United States*; 2006 Aug;74(8):4766–77.
 12. Hava DL, Camilli A. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol. England*; 2002 Sep;45(5):1389–406.
 13. Orihuela CJ, Radin JN, Sublett JE, Gao G, Kaushal D, Tuomanen EI. Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun. United States*; 2004 Oct;72(10):5582–96.
 14. Silva NA, McCluskey J, Jefferies JMC, Hinds J, Smith A, Clarke SC, et al. Genomic diversity between strains of the same serotype and multilocus sequence type

- among pneumococcal clinical isolates. *Infect Immun.* United States; 2006 Jun;74(6):3513–8.
15. Dawid S, Roche AM, Weiser JN. The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect Immun.* United States; 2007 Jan;75(1):443–51.
 16. Oggioni MR, Trappetti C, Kadioglu A, Cassone M, Iannelli F, Ricci S, et al. Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol.* England; 2006 Sep;61(5):1196–210.
 17. Zhang Q, Bagrale L, Bernatoniene J, Clarke E, Paton JC, Mitchell TJ, et al. Low CD4 T cell immunity to pneumolysin is associated with nasopharyngeal carriage of pneumococci in children. *J Infect Dis.* United States; 2007 Apr;195(8):1194–202.
 18. Hirst RA, Kadioglu A, O’callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol.* England; 2004 Nov;138(2):195–201.
 19. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* England; 1997 Sep;25(5):819–29.
 20. Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun.* United States; 2004 May;72(5):3077–80.
 21. Weidenmaier C, Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* England;

- 2008 Apr;6(4):276–87.
22. Jedrzejak MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev. United States*; 2001 Jun;65(2):187–207 ; first page, table of contents.
 23. Paterson GK, Mitchell TJ. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes Infect. France*; 2006 Jan;8(1):145–53.
 24. Rosch JW, Mann B, Thornton J, Sublett J, Tuomanen E. Convergence of regulatory networks on the pilus locus of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun. United States*; 2008 Jul;76(7):3187–96.
 25. Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL, et al. The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol. England*; 2001 Sep;41(6):1395–408.
 26. Munoz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C, Marco F, Navarro M, Bartolome R, et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect. England*; 2011 Aug;63(2):151–62.
 27. 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. Netherlands*; 2010 Dec;29(2):283–8.
 28. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis. United States*; 2003 May;187(9):1424–32.

29. Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis.* United States; 2006 Sep;194(5):682–8.
30. Grau I, Ardanuy C, Calatayud L, Rolo D, Domenech A, Linares J, et al. Invasive pneumococcal disease in healthy adults: increase of empyema associated with the clonal-type Sweden(1)-ST306. *PLoS One.* United States; 2012;7(8):e42595.
31. Lujan M, Gallego M, Belmonte Y, Fontanals D, Valles J, Lisboa T, et al. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteraemic pneumonia. *Eur Respir J.* Switzerland; 2010 Nov;36(5):1073–9.
32. Alanee SRJ, McGee L, Jackson D, Chiou CC, Feldman C, Morris AJ, et al. Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an international study. *Clin Infect Dis.* United States; 2007 Jul;45(1):46–51.
33. del Amo E, Brotons P, Monsonis M, Trivino M, Inigo M, Selva L, et al. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect.* France; 2014 Jul;20(7):684–9.
34. del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, Trivino M, et al. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Germany; 2015 Apr;34(4):705–11.
35. Romney MG, Hull MW, Gustafson R, Sandhu J, Champagne S, Wong T, et al. Large community outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 invasive infection in an impoverished, urban population. *Clin Infect Dis.* United States;

- 2008 Sep;47(6):768–74.
36. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. United States; 2006 Feb;124(4):783–801.
 37. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. United States; 2006;24:353–89.
 38. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. England; 1995 Oct;377(6548):435–8.
 39. Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol*. United States; 2006 Aug;80(2):267–77.
 40. Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, Snapper CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol*. Netherlands; 2007 Feb;245(2):103–10.
 41. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku C-L, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. United States; 2008 Aug;321(5889):691–6.
 42. Ku C-L, von Bernuth H, Picard C, Zhang S-Y, Chang H-H, Yang K, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med*. United States; 2007 Oct;204(10):2407–22.

43. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* United States; 2001 Apr;69(4):513–21.
44. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* United States; 2015 Apr;109:14.12.1-10.
45. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy.* Switzerland; 2007;92:50–7.
46. Krysko D V, D’Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.* Netherlands; 2006 Oct;11(10):1709–26.
47. Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. *J Infect.* England; 2015 Jun;71 Suppl 1:S112-20.
48. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.* England; 2004 Feb;23(2):327–33.
49. van der Poll T, Keogh C V, Buurman WA, Lowry SF. Passive immunization against tumor necrosis factor-alpha impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* United States; 1997 Feb;155(2):603–8.
50. Rijneveld AW, Florquin S, Branger J, Speelman P, Van Deventer SJ, van der Poll T. TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* United States; 2001 Nov;167(9):5240–6.
51. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, et al. Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol.* United States; 2003

- Nov;171(10):5380–8.
52. Rijneveld AW, de Vos AF, Florquin S, Verbeek JS, van der Poll T. CD11b limits bacterial outgrowth and dissemination during murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis. United States*; 2005 May;191(10):1755–60.
 53. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2002 Dec;99(26):16969–74.
 54. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MPE, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis. United States*; 2015 May;15(5):535–43.
 55. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One. United States*; 2017;12(5):e0177113.
 56. Backhaus E, Berg S, Andersson R, Ockborn G, Malmstrom P, Dahl M, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors. *BMC Infect Dis. England*; 2016 Aug;16:367.
 57. Risk Factors for Invasive Pneumococcal Disease in Children in the Era of Conjugate Vaccine Use. [cited 2017 Aug 17]; Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/early/2010/06/14/peds.2009-2150.full.pdf>

58. Advisory Committee on Immunization Practices. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports* [Internet]. 2000 Oct 6 [cited 2017 Aug 17];49(RR-9):1–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055835>
59. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, Hollegaard M V., Sørensen HT, Hougaard DM, et al. Genetic Variation in NFKBIE Is Associated With Increased Risk of Pneumococcal Meningitis in Children. *EBioMedicine* [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Aug 17];3:93–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26870821>
60. Carrasco-Colom J, Jordan I, Alsina L, Garcia-Garcia J-J, Cambra-Lasaosa FJ, Martín-Mateos MA, et al. Association of Polymorphisms in IRAK1, IRAK4 and MyD88, and Severe Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Aug 17];34(9):1008–13. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0006454-201509000-00022>
61. Lingappa JR, Dumitrescu L, Zimmer SM, Lynfield R, McNicholl JM, Messonnier NE, et al. Identifying Host Genetic Risk Factors in the Context of Public Health Surveillance for Invasive Pneumococcal Disease. Reitsma PH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Aug 15 [cited 2017 Aug 17];6(8):e23413. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858107>
62. Chapman KE, Wilson D, Gorton R. Invasive pneumococcal disease and socioeconomic deprivation: a population study from the North East of England. *J*

- Public Health (Bangkok) [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2017 Aug 17];35(4):558–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447693>
63. Shen P, Morissette MC, Vanderstocken G, Gao Y, Hassan M, Roos A, et al. Cigarette Smoke Attenuates the Nasal Host Response to *Streptococcus pneumoniae* and Predisposes to Invasive Pneumococcal Disease in Mice. Pirofski L, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2016 May [cited 2017 Aug 17];84(5):1536–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26930709>
64. Chowdhury PP, Mawokomatanda T, Xu F, Gamble S, Flegel D, Pierannunzi C, et al. Surveillance for Certain Health Behaviors, Chronic Diseases, and Conditions, Access to Health Care, and Use of Preventive Health Services Among States and Selected Local Areas — Behavioral Risk Factor Surveillance System, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* [Internet]. 2016 Apr 29 [cited 2017 Aug 17];65(4):1–142. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27124212>
65. Baxter R, Yee A, Aukes L, Snow V, Fireman B, Atkinson B, et al. Risk of underlying chronic medical conditions for invasive pneumococcal disease in adults. *Vaccine* [Internet]. 2016 Aug 5 [cited 2017 Aug 17];34(36):4293–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27396493>
66. Hanada S, Iwata S, Kishi K, Morozumi M, Chiba N, Wajima T, et al. Host Factors and Biomarkers Associated with Poor Outcomes in Adults with Invasive Pneumococcal Disease. Stover CM, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jan 27 [cited 2017 Aug 17];11(1):e0147877. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26815915>
67. Kuster SP, Rudnick W, Shigayeva A, Green K, Baqi M, Gold WL, et al. Previous

- Antibiotic Exposure and Antimicrobial Resistance in Invasive Pneumococcal Disease: Results From Prospective Surveillance. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2017 Aug 17];59(7):944–52. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973312>
68. Hirschfeld AF, Bettinger JA, Victor RE, Davidson DJ, Currie AJ, Ansermino JM, et al. Prevalence of Toll-like receptor signalling defects in apparently healthy children who developed invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2017 Aug 17];122(3):271–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157070>
69. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol. Netherlands*; 2015 Nov;35(8):696–726.
70. Mongardon N, Max A, Bouglé A, Pène F, Lemiale V, Charpentier J, et al. Epidemiology and outcome of severe pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study. *Crit Care* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2017 Aug 17];16(4):R155. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894879>
71. Garcia-Vidal C, Carratalà J, Fernández-Sabé N, Dorca J, Verdaguer R, Manresa F, et al. Aetiology of, and risk factors for, recurrent community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Aug 17];15(11):1033–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19673961>
72. Gulmez SE, Holm A, Frederiksen H, Jensen TG, Pedersen C, Hallas J. Use of

- Proton Pump Inhibitors and the Risk of Community-Acquired Pneumonia. Arch Intern Med [Internet]. 2007 May 14 [cited 2017 Aug 17];167(9):950. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502537>
73. Hjuler T, Wohlfahrt J, Simonsen J, Kaltoft MS, Koch A, Kamper-Jorgensen M, et al. Perinatal and Crowding-Related Risk Factors for Invasive Pneumococcal Disease in Infants and Young Children: A Population-Based Case-Control Study. Clin Infect Dis [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2017 Aug 17];44(8):1051–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17366448>
 74. Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, et al. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. Pediatrics. United States; 2008 Aug;122(2):229–37.
 75. Burgos J, Larrosa MN, Martinez A, Belmonte J, Gonzalez-Lopez J, Rello J, et al. Impact of influenza season and environmental factors on the clinical presentation and outcome of invasive pneumococcal disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Germany; 2015 Jan;34(1):177–86.
 76. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Pneumovax), pneumococcal polysaccharide vaccine, and anti. Pediatrics. United States; 2000 Aug;106(2 Pt 1):362–6.
 77. Pneumococcal vaccines WHO position paper - 2012 - recommendations. Vaccine. Netherlands; 2012 Jul;30(32):4717–8.
 78. Nuorti JP, Whitney CG. Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent

- pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports*. United States; 2010 Dec;59(RR-11):1–18.
79. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. England; 2009 Sep;374(9693):893–902.
80. King MD, Whitney CG, Parekh F, Farley MM. Recurrent invasive pneumococcal disease: a population-based assessment. *Clin Infect Dis*. United States; 2003 Oct;37(8):1029–36.
81. Deloria Knoll M, Park DE, Johnson TS, Chandir S, Nonyane BAS, Conklin L, et al. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on immunogenicity. *Pediatr Infect Dis J*. United States; 2014 Jan;33 Suppl 2:S119-29.
82. Millar EV, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Reid R, Santosham M, et al. Indirect Effect of 7 - Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Colonization among Unvaccinated Household Members. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Oct 15 [cited 2017 Aug 17];47(8):989–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781875>
83. Isaacman DJ, Fletcher MA, Fritzell B, Ciuryla V, Schranz J. Indirect effects associated with widespread vaccination of infants with heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7; Prevnar). *Vaccine* [Internet]. 2007 Mar 22 [cited 2017 Aug 17];25(13):2420–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049677>
84. Weatherholtz R, Millar EV, Moulton LH, Reid R, Rudolph K, Santosham M, et al.

- Invasive Pneumococcal Disease a Decade after Pneumococcal Conjugate Vaccine Use in an American Indian Population at High Risk for Disease. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2017 Aug 17];50(9):1238–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367225>
85. Grant LR, Hammitt LL, O'Brien SE, Jacobs MR, Donaldson C, Weatherholtz RC, et al. Impact of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Carriage Among American Indians. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Aug 17];35(8):907–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171679>
86. O'Brien KL, Dagan R. The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2003 May 16 [cited 2017 Aug 17];21(17–18):1815–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706665>
87. Zangwill KM, Vadheim CM, Vannier AM, Hemenway LS, Greenberg DP, Ward JI. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in southern California: implications for the design and conduct of a pneumococcal conjugate vaccine efficacy trial. *J Infect Dis. United States*; 1996 Oct;174(4):752–9.
88. Tan TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Microbiol Rev. United States*; 2012 Jul;25(3):409–19.
89. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis. United States*; 2015 Mar;15(3):301–9.

90. Hanquet G, Perrocheau A, Kissling E, Bruhl DL, Tarragó D, Stuart J, et al. Surveillance of invasive pneumococcal disease in 30 EU countries: Towards a European system? *Vaccine* [Internet]. 2010 May 21 [cited 2017 Aug 17];28(23):3920–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20394721>
91. Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt H-J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Dec 14 [cited 2017 Aug 17];15(1):419. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468008>
92. Feikin DR, Kagucia EW, Loo JD, Link-Gelles R, Puhon MA, Cherian T, et al. Serotype-Specific Changes in Invasive Pneumococcal Disease after Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction: A Pooled Analysis of Multiple Surveillance Sites. Viboud C, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2013 Sep 24 [cited 2017 Aug 17];10(9):e1001517. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086113>
93. Hanquet G, Kissling E, Fenoll A, George R, Lepoutre A, Lernout T, et al. Pediatric Pneumococcal Serotypes in 4 European Countries. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2010 Sep [cited 2017 Aug 17];16(9):1428–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735928>
94. 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* [Internet]. 2011 Oct [cited 2017 Aug 17];11(10):760–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309911700901>
95. Munoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R.

- Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis. United States*; 2008 Jan;46(2):174–82.
96. Savulescu C, Krizova P, Lepoutre A, Mereckiene J, Vestrheim DF, Ciruela P, et al. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SplDnet countries: an observational multicentre study. *Lancet Respir Med [Internet]*. 2017 Aug [cited 2017 Aug 17];5(8):648–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28359798>
97. Pallares R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF, et al. Resistance to Penicillin and Cephalosporin and Mortality from Severe Pneumococcal Pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med [Internet]*. 1995 Aug 24 [cited 2017 Aug 17];333(8):474–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7623879>
98. Oteo J, Lazaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J, Spanish Members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Trends in Antimicrobial Resistance in 1,968 Invasive *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Spanish Hospitals (2001 to 2003): Decreasing Penicillin Resistance in Children's Isolates. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2004 Dec 1 [cited 2017 Aug 17];42(12):5571–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583283>
99. Aristegui J, Bernaola E, Pocheville I, García C, Arranz L, Durán G, et al. Reduction in pediatric invasive pneumococcal disease in the Basque Country and Navarre, Spain, after introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]*. 2007 May 4 [cited 2017 Aug

- 17];26(5):303–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-007-0294-4>
100. Salleras L, Domínguez A, Ciruela P, Izquierdo C, Navas E, Torner N, et al. Changes in serotypes causing invasive pneumococcal disease (2005–2007 vs. 1997–1999) in children under 2 years of age in a population with intermediate coverage of the 7-valent pneumococcal conjugated vaccine. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Aug 17];15(11):997–1001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689466>
101. Ciruela P, Martínez A, Izquierdo C, Hernández S, Broner S, Muñoz-Almagro C, et al. Epidemiology of vaccine-preventable invasive diseases in Catalonia in the era of conjugate vaccines. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 Aug 17];9(3):681–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303166>
102. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Gimenez MJ, Aragoneses-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* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2017 Aug 17];47(4):1012–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225097>
103. Ardanuy C, Tubau F, Pallares R, Calatayud L, Domínguez MA, Rolo D, et al. Epidemiology of Invasive Pneumococcal Disease among Adult Patients in Barcelona Before and After Pediatric 7 - Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction, 1997–2007. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Aug 17];48(1):57–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19035779>

104. Muñoz-Almagro C, Esteva C, Fernandez de Sevilla M, Selva L, Gene A, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. *J Infect* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Aug 17];59(2):75–82. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576637>
105. Esteva C, Selva L, de Sevilla MF, Garcia-Garcia JJ, Pallares R, Muñoz-Almagro C. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 causing invasive disease among children in Barcelona over a 20-year period (1989–2008). *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Aug 17];17(9):1441–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729192>
106. del Amo E, Esteva C, Hernandez-Bou S, Galles C, Navarro M, Sauca G, et al. Serotypes and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in the Era of PCV13 in Catalonia, Spain. de Lencastre H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 8 [cited 2017 Aug 17];11(3):e0151125. Available from:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0151125>
107. Olarte L, Barson WJ, Barson RM, Lin PL, Romero JR, Tan TQ, et al. Impact of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Meningitis in US Children. *Clin Infect Dis. United States*; 2015 Sep;61(5):767–75.
108. Myers C, Gervaix A. *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in children. *Int J Antimicrob Agents. Netherlands*; 2007 Nov;30 Suppl 1:S24-8.
109. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA. United States*; 2001 Apr;285(13):1729–35.

110. Kuppermann N. Occult bacteremia in young febrile children. *Pediatr Clin North Am. United States*; 1999 Dec;46(6):1073–109.
111. Ishimine P. Fever without source in children 0 to 36 months of age. *Pediatr Clin North Am. United States*; 2006 Apr;53(2):167–94.
112. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998–2007. *N Engl J Med. United States*; 2011 May;364(21):2016–25.
113. Casado-Flores J, Rodrigo C, Aristegui J, Martinon JM, Fenoll A, Mendez C. Decline in pneumococcal meningitis in Spain after introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J. United States*; 2008 Nov;27(11):1020–2.
114. Baraff LJ, Lee SI, Schriger DL. Outcomes of bacterial meningitis in children: a meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J. UNITED STATES*; 1993 May;12(5):389–94.
115. Kaplan SL, Mason EOJ, Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, et al. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children’s hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics. United States*; 2004 Mar;113(3 Pt 1):443–9.
116. Tsai CJ, Griffin MR, Nuorti JP, Grijalva CG. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. *Clin Infect Dis. United States*; 2008 Jun;46(11):1664–72.
117. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med. United States*; 2003

May;348(18):1737–46.

118. Del Amo E, Esteva C, Hernandez-Bou S, Galles C, Navarro M, Sauca G, et al. Serotypes and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in the Era of PCV13 in Catalonia, Spain. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2016 [cited 2017 Aug 17];11(3):e0151125. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26953887>
119. Saha S, Darmstadt G, Naheed A, Arifeen S, Islam M, Fatima K, et al. Improving the Sensitivity of Blood Culture for *Streptococcus pneumoniae*. *J Trop Pediatr* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2017 Aug 17];57(3):192–6. Available from: <https://academic.oup.com/tropej/article-lookup/doi/10.1093/tropej/fmq070>
120. Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2017 Aug 17];45(3):816–21. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02064-06>
121. Resti M, Micheli A, Moriondo M, Becciolini L, Cortimiglia M, Canessa C, et al. Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: A prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther* [Internet]. 2009 Jun [cited 2017 Aug 17];31(6):1266–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695393>
122. Munoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarrago D, Pallares R. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Germany; 2011 Mar;30(3):327–35.

123. Ceyhan M, Yildirim I, Sheppard CL, George RC. Pneumococcal serotypes causing pediatric meningitis in Turkey: application of a new technology in the investigation of cases negative by conventional culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2010 Mar 20 [cited 2017 Aug 17];29(3):289–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087750>
124. Azzari C, Cortimiglia M, Moriondo M, Canessa C, Lippi F, Ghiori F, et al. Pneumococcal DNA is not detectable in the blood of healthy carrier children by real-time PCR targeting the *lytA* gene. *J Med Microbiol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2017 Aug 17];60(6):710–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349984>
125. Lahti E, Mertsola J, Kontiokari T, Eerola E, Ruuskanen O, Jalava J. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2006 Nov 17 [cited 2017 Aug 17];25(12):783–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089094>
126. McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, et al. Sensitive and Specific Method for Rapid Identification of *Streptococcus pneumoniae* Using Real-Time Fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2017 Aug 17];39(10):3446–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574554>
127. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, et al. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J Med*

- Microbiol [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2017 Aug 17];57(10):1205–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809546>
128. Hare KM, Smith-Vaughan H, Binks M, Park IH, Nahm MH, Leach AJ. "Dodgy 6As": Differentiating Pneumococcal Serotype 6C from 6A by Use of the Quellung Reaction. J Clin Microbiol [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2017 Aug 17];47(6):1981–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357203>
129. Sanz JC, Culebras E, Rios E, Rodriguez-Avial I, Wilhelmi I, Ramos B, et al. Direct Serogrouping of Streptococcus pneumoniae Strains in Clinical Samples by Use of a Latex Agglutination Test. J Clin Microbiol [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2017 Aug 17];48(2):593–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007395>
130. Rajalakshmi B, Kanungo R. Cost-effective method of serotyping Streptococcus pneumoniae using staphylococcal co-agglutination. Indian J Med Microbiol [Internet]. [cited 2017 Aug 17];19(4):197–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17664832>
131. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. J Clin Microbiol [Internet]. 1997 Mar [cited 2017 Aug 17];35(3):764–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041430>
132. Tarrago D, Fenoll A, Sanchez-Tatay D, Arroyo LA, Munoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. Clin Microbiol Infect. France; 2008 Sep;14(9):828–34.

133. Selva L, Berger C, Garcia-Garcia JJ, de Paz H, Nadal D, Munoz-Almagro C. Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*. United States; 2014. p. 2736–7.
134. Wang Q, Wang M, Kong F, Gilbert GL, Cao B, Wang L, et al. Development of a DNA microarray to identify the *Streptococcus pneumoniae* serotypes contained in the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine and closely related serotypes. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2007 Jan [cited 2017 Aug 17];68(1):128–36. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701206002156>
135. Tomita Y, Okamoto A, Yamada K, Yagi T, Hasegawa Y, Ohta M. A new microarray system to detect *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 17];2011:352736. Available from:
<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/352736/>
136. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* [Internet]. 1998 Nov 1 [cited 2017 Aug 17];144(11):3049–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846740>
137. Elberse KEM, Nunes S, Sá-Leão R, van der Heide HGJ, Schouls LM. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis for *Streptococcus pneumoniae*: Comparison with PFGE and MLST. Gagneux S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 May 26 [cited 2017 Aug 17];6(5):e19668. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637335>
138. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral

- innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol*. United States; 2010;28:157–83.
139. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. England; 2002 May;2(5):346–53.
140. Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*. Denmark; 2006 Sep;68(3):193–209.
141. Roy S, Knox K, Segal S, Griffiths D, Moore CE, Welsh KI, et al. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet*. England; 2002 May;359(9317):1569–73.
142. Boldt ABW, Messias-Reason IJ, Meyer D, Schrago CG, Lang F, Lell B, et al. Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes. *BMC Genet*. England; 2010;11:38.
143. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol*. England; 2003 Sep;40(2–4):73–84.
144. Petersen S V, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol*. England; 2001 Aug;38(2–3):133–49.
145. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016;274(1):74–97.
146. Guo N, Mogue T, Weremowicz S, Morton CC, Sastry KN. The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. *Mamm Genome*. United States; 1998 Mar;9(3):246–9.

147. Wallis R, Shaw JM, Uitdehaag J, Chen C-B, Torgersen D, Drickamer K. Localization of the serine protease-binding sites in the collagen-like domain of mannose-binding protein: indirect effects of naturally occurring mutations on protease binding and activation. *J Biol Chem.* United States; 2004 Apr;279(14):14065–73.
148. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* UNITED STATES; 1995 Sep;155(6):3013–20.
149. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* United States; 2001 Sep;194(6):781–95.
150. Wallis R, Dodds AW, Mitchell DA, Sim RB, Reid KBM, Schwaeble WJ. Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway. *J Biol Chem.* United States; 2007 Mar;282(11):7844–51.
151. Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjöholm A, Matsushita M, Jensenius JC. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol.* England; 2007 Feb;19(2):141–9.
152. Ip WKE, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev.* England; 2009 Jul;230(1):9–21.
153. Frederiksen PD, Thiel S, Jensen L, Hansen AG, Matthiesen F, Jensenius JC. Quantification of mannan-binding lectin. *J Immunol Methods.* Netherlands; 2006 Aug;315(1–2):49–60.
154. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the

- relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol*. England; 2002 Dec;56(6):630–41.
155. Garred P, Thiel S, Madsen HO, Ryder LP, Jensenius JC, Svejgaard A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. *Clin Exp Immunol*. England; 1992 Dec;90(3):517–21.
156. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, et al. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis*. United States; 2007 Jun;44(12):1593–601.
157. Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet*. Sweden; 2000;2(3):305–22.
158. Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes TP, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood*. United States; 2002 May;99(10):3524–9.
159. Sallenbach S, Thiel S, Aebi C, Otth M, Bigler S, Jensenius JC, et al. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatr Allergy Immunol*. England; 2011 Jun;22(4):424–30.
160. Lau YL, Chan SY, Turner MW, Fong J, Karlberg J. Mannose-binding protein in preterm infants: developmental profile and clinical significance. *Clin Exp*

- Immunol. England; 1995 Dec;102(3):649–54.
161. Lee S-G, Yum J-S, Moon HM, Kim HJ, Yang YJ, Kim H-L, et al. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Mol Immunol.* England; 2005 May;42(8):969–77.
 162. Sorensen CM, Hansen TK, Steffensen R, Jensenius JC, Thiel S. Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. *Clin Exp Immunol.* England; 2006 Jul;145(1):173–82.
 163. Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol.* England; 1992 Oct;90(1):31–5.
 164. Smithson A, Perello R, Aibar J, Espinosa G, Tassies D, Freire C, et al. Genotypes coding for low serum levels of mannose-binding lectin are underrepresented among individuals suffering from noninfectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Vaccine Immunol.* United States; 2010 Mar;17(3):447–53.
 165. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* England; 2006 Mar;7(2):85–94.
 166. Eisen DP, Dean MM, Boermeester MA, Fidler KJ, Gordon AC, Kronborg G, et al. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin Infect Dis.* United States; 2008 Aug;47(4):510–6.
 167. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun.* UNITED STATES; 2000 Feb;68(2):688–93.
 168. van Emmerik LC, Kuijper EJ, Fijen CA, Dankert J, Thiel S. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin Exp Immunol.*

- ENGLAND; 1994 Sep;97(3):411–6.
169. Vuononvirta J, Toivonen L, Grondahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff A-M, Lindholm L, Mertsola J, et al. Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2 and 4 in infants. *PLoS One*. United States; 2011;6(10):e26198.
 170. Munoz-Almagro C, Bautista C, Arias MT, Boixeda R, Del Amo E, Borrás C, et al. High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in young children with invasive pneumococcal disease. *Clin Microbiol Infect*. England; 2014 Oct;20(10):O745-52.
 171. Giubergia V, Salim M, Fraga J, Castiglioni N, Sen L, Castanos C, et al. Post-infectious bronchiolitis obliterans and mannose-binding lectin insufficiency in Argentinean children. *Respirology*. Australia; 2015 Aug;20(6):982–6.
 172. Speletas M, Gounaris A, Sevdali E, Kompoti M, Konstantinidi K, Sokou R, et al. MBL2 genotypes and their associations with MBL levels and NICU morbidity in a cohort of Greek neonates. *J Immunol Res*. Egypt; 2015;2015:478412.
 173. Darton TC, Jack DL, Johnson M, Borrow R, Guiver M, Kaczmarski EB, et al. MBL2 deficiency is associated with higher genomic bacterial loads during meningococemia in young children. *Clin Microbiol Infect*. England; 2014 Dec;20(12):1337–42.
 174. Dommett R, Chisholm J, Turner M, Bajaj-Elliott M, Klein NJ. Mannose-binding lectin genotype influences frequency and duration of infectious complications in children with malignancy. *J Pediatr Hematol Oncol*. United States; 2013 Jan;35(1):69–75.
 175. Pana ZD, Samarah F, Papi R, Antachopoulos C, Papageorgiou T, Farmaki E, et al.

- Mannose binding lectin and ficolin-2 polymorphisms are associated with increased risk for bacterial infections in children with B acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. United States; 2014 Jun;61(6):1017–22.
176. Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodriguez de Castro F, Aspa J, Briones ML, Garcia-Saavedra A, et al. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol*. United States; 2008 Aug;122(2):368–74, 374-2.
177. Kronborg G, Weis N, Madsen HO, Pedersen SS, Wejse C, Nielsen H, et al. Variant mannose-binding lectin alleles are not associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in randomly included patients. *J Infect Dis*. United States; 2002 May;185(10):1517–20.
178. Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog*. United States; 2012;8(7):e1002793.
179. Garcia-Laorden MI, Rodriguez de Castro F, Sole-Violan J, Payeras A, Briones ML, Borderias L, et al. The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *Eur Respir J*. Switzerland; 2013 Jan;41(1):131–9.
180. Moens L, Van Hoeyveld E, Peetermans WE, De Boeck C, Verhaegen J, Bossuyt X. Mannose-binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum Immunol*. United States; 2006 Aug;67(8):605–11.
181. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, Hollegaard MV, Sorensen HT, Hougaard DM, et al. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms are not associated

- with susceptibility to invasive pneumococcal disease in children. *Clin Infect Dis*. United States; 2014 Aug;59(4):e66-71.
182. Bateman SL, Seed PC. Procession to pediatric bacteremia and sepsis: covert operations and failures in diplomacy. *Pediatrics*. United States; 2010 Jul;126(1):137–50.
183. Selva L, Ciruela P, Blanchette K, del Amo E, Pallares R, Orihuela CJ, et al. Prevalence and clonal distribution of pcpA, psrP and Pilus-1 among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*. United States; 2012;7(7):e41587.
184. Endo Y, Takahashi M, Iwaki D, Ishida Y, Nakazawa N, Kodama T, et al. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol*. United States; 2012 Dec;189(12):5860–6.
185. Israels J, Scherpbier HJ, Frakking FNJ, van de Wetering MD, Kremer LCM, Kuijpers TW. Mannose-binding lectin and the risk of HIV transmission and disease progression in children: a systematic review. *Pediatr Infect Dis J*. United States; 2012 Dec;31(12):1272–8.
186. Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA*. United States; 2001 Mar;285(10):1316–21.
187. Frakking FNJ, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, et al. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clin Exp Immunol*. England; 2006 Jul;145(1):5–12.
188. Brouwer MC, Baas F, van der Ende A, van de Beek D. Genetic variation and

- cerebrospinal fluid levels of mannose binding lectin in pneumococcal meningitis patients. PLoS One. United States; 2013;8(5):e65151.
189. Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. J Infect Dis. United States; 2001 Nov;184(9):1152–62.
 190. Sprong T, Jack DL, Klein NJ, Turner MW, van der Ley P, Steeghs L, et al. Mannose binding lectin enhances IL-1beta and IL-10 induction by non-lipopolysaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. Cytokine. United States; 2004 Oct;28(2):59–66.
 191. Garred P, Honore C, Ma YJ, Rorvig S, Cowland J, Borregaard N, et al. The genetics of ficolins. J Innate Immun. Switzerland; 2010;2(1):3–16.
 192. Chiarini M, Sabelli C, Melotti P, Garlanda C, Savoldi G, Mazza C, et al. PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients. Genes Immun. England; 2010 Dec;11(8):665–70.
 193. Madsen J, Mollenhauer J, Holmskov U. Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. Innate Immun. United States; 2010 Jun;16(3):160–7.
 194. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. PLoS Pathog. United States; 2013 Jan;9(1):e1003057.
 195. Launes C, Garcia-Garcia J-J, Trivino M, Peris N, Pallares R, Munoz-Almagro C. Respiratory viruses, such as 2009 H1N1 influenza virus, could trigger temporal trends in serotypes causing pneumococcal disease. Clin Microbiol Infect.

- England; 2014 Dec;20(12):O1088-90.
196. Moreno-Pérez D, Álvarez García FJ, Aristegui Fernández J, Cilleruelo Ortega MJ, Corretger Rauet JM, García Sánchez N, et al. Calendario de vacunaciones de la Asociación Española de Pediatría (CAV-AEP): recomendaciones 2017. An Pediatría [Internet]. Elsevier; 2017 Feb 1 [cited 2017 Jun 21];86(2):98.e1-98.e9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1695403316302934>
 197. Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. United States; 2005 May;6(3 Suppl):S55-60.
 198. Angus DC, Burgner D, Wunderink R, Mira J-P, Gerlach H, Wiedermann CJ, et al. The PIRO concept: P is for predisposition. *Critical care (London, England)*. England; 2003. p. 248–51.
 199. Vincent J-L, Opal S, Torres A, Bonten M, Cohen J, Wunderink R. The PIRO concept: I is for infection. *Critical care (London, England)*. England; 2003. p. 252–5.
 200. Gerlach H, Dhainaut J-F, Harbarth S, Reinhart K, Marshall JC, Levy M. The PIRO concept: R is for response. *Critical care (London, England)*. England; 2003. p. 256–9.
 201. Vincent J-L, Wendon J, Groeneveld J, Marshall JC, Streat S, Carlet J. The PIRO concept: O is for organ dysfunction. *Critical care (London, England)*. England; 2003. p. 260–4.
 202. Moreno RP, Metnitz B, Adler L, Hoechstl A, Bauer P, Metnitz PGH. Sepsis mortality prediction based on predisposition, infection and response. *Intensive Care Med*. United States; 2008 Mar;34(3):496–504.
 203. Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI. Proof of

principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. Crit Care Med. United States; 2011 Feb;39(2):322–7.

8. ABREVIATURES

AAP, American Academy of Pediatrics

ADN, àcid desoxiribonucleic

ATP, Trifosfat d'adenosina

C3a/C3b, Component del complement 3a o 3b

CDC, Centers for disease control and prevention

ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IgA, Immunoglobulina tipus A

IRAK, interleukin receptor associated to kinase

LCR, líquid cefaloraquidi

IyA, autolisina

MASP, proteases associades a MBL

MyD88, myeloid differentiation primary response factor 88 adaptor like

MPI, Malaltia pneumocòccica invasiva

MBL, *Mannose-binding lectin*

MBL2, *gen humà de la MBL*

MLEE, *multilocus enzyme electrophoresis*

MLVA, *multilocus variable number of tandem repeat analysis*

NK, *natural killer*

PAFR, Platelet activator factor receptor

PCR, reacció en cadena de la polimerasa

PCV7, vacuna pneumocòccica conjugada 7-valent

PCV10, vacuna pneumocòccica conjugada 10-valent

PCV13, vacuna pneumocòccica conjugada 13-valent

Ply, pneumolisina

PPSV23, vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent

SNP, *single nucleòtid polymorphism*

S.pneumoniae, *Streptococcus pneumoniae*

TLR, *Toll-like receptor*

TNF, factor de necrosi tumoral

UCIP, unitat de cures intensives pediàtriques

VIH, virus de la immunodeficiència humana

