



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Epidemiología y sensibilidad antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en muestras invasivas en el HCU “Lozano Blesa” de Zaragoza (2013-2016)

Epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in invasive samples from HCU “Lozano Blesa” in Zaragoza (2013-2016)

Autor

Marina Selene Falcón Vega

Director

Sonia Algarate Cajo

Facultad de Medicina
2016-2017

ÍNDICE

I. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
II. ABSTRACT AND KEYWORDS.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. MUESTRAS.....	10
3.2. PROCESAMIENTO	10
3.2.1. <i>Incubación y detección.....</i>	<i>10</i>
3.2.2. <i>Cultivo.....</i>	<i>11</i>
3.3. IDENTIFICACIÓN	11
3.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	13
3.4.1. <i>Microdilución en caldo.....</i>	<i>13</i>
3.4.2. <i>Antibiograma disco-placa</i>	<i>14</i>
3.5. HISTORIA CLÍNICA	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26

I. RESUMEN

La Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI), se define como la diseminación de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) en sangre o Líquido Cefalorraquídeo (LCR), fluidos que en condiciones normales son estériles. Se trata de un problema de Salud Pública, ya que a pesar de la introducción de vacunas polisacáridas y conjugadas y de la mejora de la atención sanitaria en las últimas décadas, su mortalidad continúa siendo elevada.

Los objetivos de este trabajo han sido conocer la epidemiología de la ENI en nuestro área de salud, analizar el papel epidemiológico, clínico y microbiológico de *S. pneumoniae* y evaluar los resultados de su sensibilidad a antimicrobianos.

Durante un periodo de tres años (2013-2016), fueron estudiadas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, 76 cepas de *S. pneumoniae* a partir de hemocultivos y líquidos biológicos. Se aislaron tras cultivo de las muestras en el sistema BacT/ALERT 3D[®] (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, Francia), Para su identificación se utilizaron diferentes técnicas como la visión directa a microscopio óptico tras tinción de gram, su sensibilidad a optoquina, aglutinación, la realización de API[®] 20 Strep (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, Francia) y/o la caracterización mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF (BRUKER[®], F. Soria, España). El estudio de sensibilidad antibiótica se llevó a cabo en la mayoría de las muestras por microdilución en caldo, mediante paneles de MicroScan[®] (Walkaway, Siemens, Health Care Diagnostics; S.L., Alemania). Además, fueron revisadas las historias clínicas de los pacientes y se registraron los datos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos de interés.

Todas las muestras procedían de servicios de hospitalización, principalmente del Servicio de Urgencias. Correspondían a 72 pacientes, 37 hombres y 35 mujeres. La mayoría de ellos presentaban foco respiratorio y 4 de ellos fallecieron en las primeras 72 horas, 2 de los cuales presentaban foco meníngeo.

De los antibióticos estudiados, se observó resistencia de alto nivel a penicilina en el 13,16% de los casos y aproximadamente un tercio de las muestras fueron resistentes a macrólidos y lincosamidas. La actividad de levofloxacino sigue siendo buena y solo se detectó una cepa resistente a cefotaxima. No se encontraron resistencias a vancomicina ni a meropenem.

PALABRAS CLAVE: *Streptococcus pneumoniae*, bacteriemia, meningitis.

II. ABSTRACT

Invasive pneumococcal disease (IPD) is defined as an infection confirmed by the isolation of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) from a normally sterile site, such as blood or cerebrospinal fluid. It is a Public Health issue, due to the fact that despite the introduction of the pneumococcal polysaccharide and conjugate vaccines, and the improvement of the medical attention during the last decades, its mortality remains high.

The aims of this work have been to get to know the epidemiology of IPD in our health area, to analyze the epidemiological, clinical and microbiological role of *S.pneumoniae*, as well as its antimicrobial susceptibility.

During a period of three years (2013-2016), 76 samples (blood cultures and biological fluids) of *S. pneumoniae* were studied in the Microbiology Laboratory at the Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” in Zaragoza. Cultivation was performed by the BacT/ALERT 3D[®] system (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, France). The identification was carried out by different techniques such as Gram Staining and direct observation with an optic microscope, Optochin sensitivity test, Latex Agglutination test, the realization of API[®] 20 Strep (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, France) and/or mass spectrometry MALDI-TOF[®] (BRUKER[®], F. Soria, Spain). The antibiotic sensitivity study was developed principally using MicroScan[®] microdilution panels (Walkaway, Siemens, Health Care Diagnostics; S.L., Germany). In addition to this, the patients' medical histories were reviewed as well as the clinical, epidemiological and microbiological data of interest was recorded.

Every sample came from Hospitalisation Services, mainly from the Emergency Department (ED). The 76 samples corresponded to 72 patients, 37 men and 35 women. Fundamentally, the focal point of infection was respiratory. Four of the patients died within the first 72 hours, two of whom presented meningitis.

From the studied antibiotics, a high-level resistance to penicillin was observed in 13,16% of the samples. Furthermore, approximately a third of the samples were resistant to macrolides and lincosamides. Levofloxacin is still effective and only one strain was resistant to cefotaxime. Neither resistance to meropenem nor to vancomycine were found.

KEYWORDS: *Streptococcus pneumoniae*, bacteremia, meningitis.

1. INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) es una de las principales causas de morbi-mortalidad a nivel mundial, produciendo, según la OMS (Organización Mundial de la Salud), un millón de muertes al año ¹. A pesar de que la protección frente a este patógeno ha aumentado con la introducción de vacunas polisacáridas y conjugadas, el gran número de serotipos existentes y su constante transformación, hacen que en la actualidad siga planteando un problema sanitario global ¹.

Se trata de un diplococo gram positivo que coloniza la rinofaringe del ser humano, su huésped principal. Así, la nasofaringe constituye tanto el reservorio como la fuente de transmisión entre individuos ^{1, 2, 3}, siendo sus portadores principales niños de entre 2 y 3 años ³. La diversidad de cuadros clínicos que produce varía desde infecciones leves como Otitis Media (OM), sinusitis o conjuntivitis, hasta enfermedades graves potencialmente mortales como neumonía, sepsis y meningitis ^{1, 2, 3, 4}, en las que se centrará este trabajo.

La Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI) se define como la infección por *S. pneumoniae* en sangre o Líquido Ceforraquídeo (LCR), fluidos que en condiciones normales son estériles. Para confirmar que existe infección es necesario aislar el germen en estos, o bien detectar su material nuclear o su antígeno mediante técnicas específicas. La ENI se compone de meningitis neumocócica, neumonía neumocócica bacteriémica y bacteriemia neumocócica sin foco confirmado ^{5, 6, 7}. La mortalidad que produce oscila entre el 5 y el 26% ⁸ y su incidencia se ve afectada por diversas variables como la localización geográfica y sus serotipos prevalentes, la época del año, la edad, la presencia de infecciones víricas concomitantes, la existencia o no de comorbilidades subyacentes y el estado de vacunación ^{3, 5, 9}. De un 10 a un 30% de las neumonías neumocócicas desarrollan bacteriemia ⁹, tanto es así que provocan el 70-86% de los casos de ENI y suponen su foco primario principal, seguido de la meningitis neumocócica en un 4-9% de los casos ⁸.

Para su identificación, técnicas como la tinción de Gram y su visión directa al microscopio óptico (observación de diplococos gram positivos lanceolados) nos

orientan hacia *S. pneumoniae*. Se trata de un organismo que crece mejor en situación de anaerobiosis (normalmente en atmósfera con CO₂)¹⁰. En condiciones aerobias veremos que el neumococo produce α-hemólisis en placas de agar sangre (oxidación de hemoglobina en metahemoglobina por acción del peróxido de hidrógeno, o H₂O₂), con una depresión central resultante del fenómeno de autólisis. Asimismo, se trata de un germen catalasa negativo (lo que lo distingue del género *Staphylococcus*), soluble en bilis y sensible a la optoquina (lo cual lo diferencia del resto de estreptococos alfa-hemolíticos)¹¹. El diagnóstico etiológico de ENI se basa en el cultivo microbiológico de *S. pneumoniae* (gold standard), si bien es cierto que su sensibilidad es baja y el crecimiento de cepas no es observable antes de 24-48 horas¹². Por ello, esta técnica suele combinarse con otras como la tinción de Gram, obteniendo buenos resultados. Con el objetivo de facilitar el diagnóstico de ENI se han desarrollado diferentes técnicas bioquímicas de equipos comerciales como Rapid ID 32 STREP, o API[®] 20 Strep, técnicas rápidas de aglutinación en látex o moleculares como la espectrometría de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Sin embargo, un problema que presentan todas estas pruebas, junto con la PCR (polymerase chain reaction) es que, a pesar de ser muy específicas, presentan muchos falsos positivos al no distinguir con suficiente precisión entre especies patógenas y no patógenas de *Streptococcus* grupo mitis¹³.¹⁴ También es posible la detección rápida de antígeno neumocócico en orina, líquido pleural y LCR por inmunocromatografía⁷, prueba que presenta una sensibilidad de hasta un 87% y una especificidad cercana al 100% en adultos, si bien es cierto que su positividad puede durar varias semanas, y que pueden producirse falsos positivos por una vacunación reciente o por un estado de portador nasofaríngeo, motivos que hacen que sea poco específica para niños^{11, 12, 15}.

Existen numerosos factores que precipitan el desequilibrio de la inmunidad del huésped y, por tanto, la aparición de ENI. Muchos de ellos, además, determinan también un peor pronóstico de esta. Entre los más importantes se encuentran una edad menor de 2 años o mayor de 65 años^{3, 4, 8}. En el caso de los niños, los mecanismos subyacentes que facilitan la producción de enfermedad invasora se relacionan con un sistema inmunológico inmaduro, especialmente frente a la cápsula polisacárida neumocócica, mientras que en los ancianos, los principales desencadenantes son las comorbilidades o enfermedades que presentan de base,

más que el estado de portador en sí ². Adicionalmente, la asplenia ¹⁶, el sexo masculino ⁸, la institucionalización ^{4, 8}, el tabaquismo, el abuso de alcohol, la desnutrición, la Diabetes Mellitus (DM), la ventilación mecánica y enfermedades crónicas o comorbilidades de base como son EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), asma, Enfermedad de Parkinson, distintos tipos de demencia, epilepsia, enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares y enfermedades crónicas hepáticas y renales, además del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), neoplasias malignas, tratamiento con glucocorticoides e inmunosupresores y, en definitiva, cualquier situación que provoque inmunodepresión favorecen la progresión a ENI ^{2, 4, 8, 9}. Además, está descrito que la bacteriemia neumocócica de origen nosocomial tiene peor pronóstico que la bacteriemia neumocócica adquirida en la comunidad ⁸, y que la mortalidad de esta aumenta con la severidad de la sepsis a la llegada al hospital y con la mayor edad del paciente ⁸. La extensión y las complicaciones derivadas de la infección, junto a un mayor tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio de un tratamiento antibiótico adecuado, disminuyen la supervivencia ⁶. Asimismo, escalas como APACHE II, pueden utilizarse como marcador pronóstico, ya que, a medida que aumenta su puntuación, lo hace también la mortalidad ⁴. En cuanto a la severidad del cuadro y su desenlace en función del origen del foco, la mayoría de estudios concluyen que la meningitis neumocócica tiene un pronóstico más sombrío ^{3, 17, 18} que los restantes tipos de ENI.

Por otra parte, los múltiples factores de virulencia del germen también juegan un papel importante a la hora de producir ENI, pero debido a que no son el objeto de esta revisión, solo se tratarán algunos de los más importantes que favorecen la adhesión, colonización e invasión bacteriana. Por ejemplo, la familia de Proteínas de Unión a Colina (*CBP*) es característica del neumococo y le proporciona a este una gran virulencia. A ella pertenecen, entre otras, proteínas como *PspA* que inhibe el complemento y dificulta la fagocitosis, y la adhesina *CbpA*, que favorece la adhesión del neumococo a la mucosa de rinofaringe y al endotelio vascular. Adicionalmente, el *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2) y la *neumolisina* (*Ply*) poseen propiedades citolíticas e inflamatorias ^{3, 9, 19}, y su acción se ve facilitada por la *autolisina* (*LytA*) ¹⁹. También cabe mencionar los *pili* debido a que promueven la adhesión ², la hialuronidasa que se encarga de degradar el ácido hialurónico presente en el tejido conectivo del huésped y de ayudar, por tanto, a la invasión de este ³, y la formación de un biofilm

que es especialmente interesante en fenómenos de diseminación local ^{2, 9}. Curiosamente, se han descrito sinergias con la microflora residente en la mucosa rinofaríngea, como por ejemplo con el virus de la gripe, y antagonismos con *S. aureus* ^{1, 2}. Finalmente, de todos ellos, el principal factor determinante de invasión neumocócica es la cápsula polisacárida ^{1, 2, 3}, la cual determina la existencia de al menos 97 serotipos diferentes ¹. Entre sus características, es notable la capacidad de evadir su aclaramiento gracias a la carga negativa capsular, y, una vez alcanzada la mucosa rinofaríngea, su habilidad para producir un cambio a cargas positivas que facilitan la adhesión al epitelio del huésped ^{2, 3}. En cuanto a la variación fenotípica de fase neumocócica, las cepas denominadas “transparentes” se adhieren y colonizan localmente con mayor facilidad pero son detectadas y aclaradas rápidamente, en comparación con las llamadas “opacas”, que presentan un mayor grosor capsular y un aumento de la producción de biofilm, características que le confieren una mayor propensión a sepsis, debido a una mejor supervivencia en el torrente sanguíneo y al incremento de adherencia al endotelio ¹. Clásicamente se consideraba que la cápsula era un requisito imprescindible para causar ENI ³, ya que ésta oculta la superficie antigénica de la bacteria y evita que sea reconocida por el sistema inmune del huésped, pero en la actualidad existen estudios que demuestran que, aunque en mucha menor medida que las cepas encapsuladas, algunas cepas no encapsuladas son capaces de producir ENI gracias al desarrollo de nuevas adhesinas como la proteína de superficie K, o a la mayor producción de biofilm respecto a las cepas encapsuladas ^{1, 9}.

Durante décadas, se ha utilizado una vacuna polisacárida válida frente a 23 serotipos (PPV-23) para la prevención de sepsis por neumococo, si bien ésta apenas resulta inmunogénica en niños menores de 2 años y además no reduce el estado de portador, motivo por el cual se utiliza en inmunocomprometidos mayores de 2 años y, en general, en mayores de 65 años ³. Con la llegada de las vacunas conjugadas (PCV-7) en el año 2001, la incidencia de ENI disminuyó considerablemente, dado que estas vacunas ejercen tanto protección directa como indirecta (inmunidad de grupo), reduciendo la colonización, densidad y duración de *S. pneumoniae* en la nasofaringe, y con ello, su progresión a enfermedad y su transmisión ^{2, 3}. De hecho, la administración de la PCV-7 en niños produjo un descenso en la mortalidad de ENI en adultos por este efecto indirecto de inmunidad de grupo ²⁰. A pesar de que las vacunas actuales han aumentado su cobertura hasta

13 serotipos (PCV-13), un gran inconveniente que presentan es que solo son efectivas frente a estos, los serotipos más virulentos y prevalentes en EEUU (Estados Unidos), y, como ya se ha mencionado anteriormente, la distribución serotípica del neumococo varía en gran medida en función de la localización geográfica, por lo que la efectividad de PCV-13 no es uniforme a nivel global ^{1, 2, 3}. Adicionalmente, en contraposición a la reducción de la incidencia de ENI por los serotipos incluidos en las vacunas conjugadas, se está produciendo un aumento de sepsis neumocócica por cepas no incluidas en ellas ⁹. Otro factor a tener en cuenta, es la existencia de cepas no encapsuladas, las cuales, si bien es cierto que no son tan virulentas como las encapsuladas, se ha reseñado su capacidad de producir ENI y, además de estar emergiendo, las vacunas conjugadas no son eficaces frente a ellas ¹. Todo esto, junto a los más de 90 serotipos existentes y su constante mutación, hacen que las vacunas neumocócicas no sean tan efectivas como se esperaba, y que quizás sea necesaria otra diana terapéutica, distinta a la cápsula polisacárida, por ejemplo aquellas dirigidas a proteínas de superficie como la *CbpA* o la fosforilcolina ^{1,2}.

La resistencia a antibióticos supone una dificultad más en la infección neumocócica. Durante años, el tratamiento de elección frente a *S. pneumoniae* ha sido la penicilina, pero el germen es resistente a ella en un 15-26% de los casos ⁹. Lo mismo sucede con la eritromicina, encontrando resistencias de hasta un 21% ⁹. La resistencia a macrólidos se debe principalmente a dos mecanismos diferentes entre sí, y cepas tanto con uno como con otro están en aumento ^{3,9}. También se han descrito resistencias a cefalosporinas. Por el momento, el único antibiótico frente al que no se han descrito resistencias es a vancomicina ^{3, 9}. Las vacunas conjugadas han reducido la prevalencia de resistencias antibióticas por varios motivos. En primer lugar, los serotipos cubiertos por ellas son los responsables de la mayoría de casos de ENI tanto sensibles como resistentes a antibióticos ^{21, 22}. En segundo lugar, al reducir el estado de portador, la vacunación disminuye también la exposición del neumococo a antibióticos y su posible posterior desarrollo de resistencias ²¹. Por otra parte, esta disminución de cepas cubiertas por las vacunas conjugadas, hace que surjan nuevas resistencias al emerger otras cepas no incluidas en la PCV-13.

En general, la administración de un tratamiento antibiótico adecuado en las primeras 4 horas tras la llegada del paciente al hospital, es un factor determinante para la supervivencia de los enfermos de ENI ⁶. Se realizarán hemocultivos y a la espera del resultado de estos, se iniciará un tratamiento empírico por vía intravenosa que variará en función de la sospecha que se tenga sobre el origen de foco primario de infección de ENI ²⁵. En todos los casos, excepto en meningitis, el tratamiento incluye un macrólido como la azitromicina asociado a un beta-lactámico como la penicilina G o amoxicilina (en altas dosis si la cepa tiene sensibilidad intermedia, o CIM ≤ 2 mg/L), o cefalosporinas de 5^a generación como la ceftarolina, de 3^a generación como cefditoreno, cefotaxima o ceftriaxona o un carbapenem cuando la cepa sea resistente a penicilina (CIM >2 mg/L). Otra opción es el empleo de una fluoroquinolona como el levofloxacino o el moxifloxacino asociado a una cefalosporina de 3^a ²³. Si se sospecha un foco meníngeo, o no puede descartarse éste, el tratamiento de elección será la vancomicina asociada a una cefalosporina de 3^a generación. En caso de alergia a penicilina o cefalosporinas se utilizará aztreonam. No se recomienda monoterapia ²³. La duración del tratamiento generalmente no debe exceder los 10-14 días. Finalmente, en el caso de la meningitis habrá que administrar dexametasona 10mg/6h antes o junto a la primera dosis antibiótica además de realizar profilaxis frente a convulsiones con fenitoína ²³, y, en todos los casos de ENI, en función del estado de gravedad del paciente, habrá que monitorizar y administrar tratamiento de soporte con oxigenoterapia, reposición de volumen, vasopresores, y valorar ingreso en UCI ²⁵. Se ha descrito que la administración temprana y combinada de antibióticos, con al menos 2 antibióticos, mejora la supervivencia ²⁴, y aquellos regímenes que incluyen macrólidos, tienen mejor resultado frente a los que no lo hacen por su efecto inmunomodulador ⁹.

2. OBJETIVOS

Hemos planteado los siguientes objetivos al inicio del estudio:

1. Conocer la epidemiología de la enfermedad neumocócica invasiva en nuestro área de salud.
2. Analizar el papel de *S. pneumoniae* en nuestro medio; sus características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas.
3. Evaluar los resultados de sensibilidad a antimicrobianos en *S. pneumoniae*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

En un periodo de 3 años, del 01/07/2013 al 01/07/2016, fueron estudiadas 76 cepas de *S. pneumoniae* aisladas en hemocultivos y líquidos biológicos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza.

Las muestras procedían de 72 pacientes, 37 hombres (51,39%) y 35 mujeres (48,61%) con edades comprendidas entre 2 meses y 94 años ($60,79 \pm 25,86$).

Los datos de los pacientes han sido obtenidos tras una exportación de los registros de los pacientes de la base de datos de nuestro hospital.

El total de las muestras corresponden a pacientes hospitalizados. El servicio principal de procedencia de las muestras fue Urgencias en 54 de las muestras (71,05%), seguido de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) en 6 de los casos (7,89%), 3 (3,95%) de Pediatría Hospitalaria, 3 (3,95%) de Medicina Interna, 3 (3,95%) de Hematología y 7 corresponden a otros servicios (9,21%).

3.2. PROCESAMIENTO

3.2.1. Incubación y detección

Los hemocultivos y líquidos biológicos fueron procesados en frascos de cultivo líquidos aerobio y anaerobio en el sistema BacT/ALERT 3D[®] (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, Francia), según las normas del fabricante.

Este sistema basa la detección de microorganismos por la detección de CO₂ que generan al metabolizar los sustratos del medio de cultivo. Un diodo emisor de luz (LED) proyecta luz sobre el sensor. Cuanto más CO₂ se genera, mayor es la cantidad de luz reflejada. Esta se compara con la lectura inicial del sensor. Si el nivel de CO₂ no varía significativamente después de 5-7 días, se determina que la muestra es negativa.

En caso de detección, los frascos son extraídos del sistema y se realiza una visión directa con microscopio óptico tras tinción de gram en la que observaremos diplococos gram positivos lanceolados. Posteriormente se realiza el pase a medios de cultivo sólidos convencionales, agar chocolate y agar CNA junto con disco de optoquina, ante la sospecha de *S. pneumoniae*.

Tras su incubación, se procede a la identificación de las colonias bacterianas observadas macroscópicamente.

3.2.2. Cultivo

Se emplearon diferentes medios de cultivo sólidos: agar chocolate y CNA (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, Francia) añadiendo disco de optoquina y se incubaron durante 24-48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

3.3. IDENTIFICACIÓN

La identificación primaria de las colonias observadas macroscópicamente en las placas de agar se realizó mediante las pruebas rápidas adicionales oportunas a estimación del experto: tinción de gram y visión directa al microscopio óptico, sensibilidad a optoquina, aglutinación, realización de API[®] 20 Strep (bioMérieux[®], Marcy l'Étoile, Francia) y/o la caracterización mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF (BRUKER[®], F. Soria, España).

Descripción de la técnica de espectrofotometría de masas (MALDI-TOF[®] realizado en equipo Microflex LT utilizando el software FlexControl (versión 3.0 Bruker Daltonics) ^{26, 27}.

1- Preparación de la muestra. Se toma una colonia aislada en cultivo puro y se deposita, formando una delgada película, sobre el pocillo de una tarjeta de análisis del espectrómetro (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Se aplica sobre los pocillos 1µL de solución matriz (solución saturada de ácido α-ciano-4-

hidroxicinámico [HCCA; Bruker Daltonics] en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2,5%), dejando después secar a temperatura ambiente.

2- Espectrometría de masas. A continuación, la tarjeta se introduce para su lectura en el espectrómetro, cuyos parámetros han de ser ajustados según las recomendaciones del fabricante. Para la calibración del equipo se utiliza la realización de un perfil proteico estándar (extracto de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, más RNA-asa y mioglobina como proteínas adicionales [BTS, Bruker Daltonics]), que se utiliza asimismo como control positivo para validar el análisis de los espectros. Los espectros para cada aislado se obtienen mediante disparos láser en distintas regiones de cada pocillo con su correspondiente muestra y se crean en función del tiempo requerido por las proteínas para llegar al detector, lo que depende de la relación masa/carga de éstas.

3- Análisis de los espectros. Los espectros obtenidos son procesados por un programa (MALDI-TOF[®] Biotyper RTC 3.0 [Bruker Daltonics Bremen, Alemania]), que genera una serie de picos y los compara con los de una base de datos de referencia, mediante un algoritmo de comparación integrado en el propio software. Una vez importado el espectro al programa, todo el proceso tiene lugar de forma automática, sin intervención por parte del usuario.

4- Valoración de los resultados. Cada espectro, al ser comparado con la base de datos permite la asignación de una puntuación. Los criterios de identificación, señalados por el fabricante, se basan en el valor de dicha puntuación en relación a un punto de corte, que se establece en 2,000. Así, una puntuación mayor de 2 indica identificación a nivel de especie; una puntuación entre 1,7 y 1,999 indica identificación fiable únicamente a nivel de género; y puntuación menor de 1,7 no permite la identificación del espectro del microorganismo con ninguno de los registrados en la base de datos.

3.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Una vez identificado *S. pneumoniae*, se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad a antibióticos mediante la realización del antibiograma.

3.4.1. Microdilución en caldo

Se realizó la técnica de dilución en placa mediante paneles de MicroScan® (Walkaway, Siemens, Health Care Diagnostics; S.L., Alemania).

Estos paneles en los que se realizan los test de sensibilidad a antimicrobianos son sistemas estandarizados, de manera que cada placa contiene una serie de pocillos de fondo en "U" que contienen concentraciones diferentes de antibióticos en forma deshidratada en el fondo de los mismos. Además, en cada placa hay pocillos de control de crecimiento. El panel se cierra con una tapa, para evitar la desecación del contenido. Requieren un tiempo de incubación entre 16 y 20 horas.

Se utilizan para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antibiótico frente a una bacteria. Después de incubar los paneles 18-24 h a 37°C y en atmósfera de CO₂ en la lectura se visualiza el panel para registrar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente a *S. pneumoniae*, esto es, el pocillo que contiene la concentración más baja de antibiótico que impide al germen desarrollarse, lo que se aprecia a simple vista por la ausencia de turbidez en el caldo.

Las categorías de interpretación de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos son tres: sensible, intermedio y resistente. Para la lectura de los resultados se utilizaron los puntos de corte establecidos, estandarizados y publicados por EUCAST²⁸.

3.4.2. Antibiograma disco-placa

En 3 de las muestras se empleó la técnica de antibiograma de difusión por disco-placa en placas de agar chocolate según normas EUCAST.

Esta técnica requiere preparar el inóculo, seleccionando colonias iguales de la placa de cultivo de 24 horas y se emulsionan en

se rota varias veces contra la pared del tubo por en

. Posteriormente se siembran las placas de agar completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando

el sellado de la misma²⁹.

A continuación, se aplicaron con una pinza estéril los discos con los antimicrobianos sobre la superficie del agar, ejerciendo una ligera presión y dejando aproximadamente 24 mm de separación entre sus respectivos centros, evitando desplazarlos una vez colocados.

Los antibióticos testados se eligen en función de la terapia de elección y alternativas para neumococos que requieren el empleo de esta técnica. A continuación, las placas se incuban a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h, tiempo tras el cual se procede a la lectura midiendo el diámetro de los halos de inhibición.

Si la siembra del inóculo se realiza adecuadamente, el desarrollo de las colonias debe ser confluyente, y la zona de inhibición uniformemente circular, debiéndose repetir el antibiograma en caso de que sólo crezcan colonias aisladas.

3.5. HISTORIA CLÍNICA

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes en los cuales se aisló *S. pneumoniae* registrando los datos epidemiológicos, clínicos y microbiológicos.

Los datos clínicos recogidos fueron: Factores de riesgo Cardiovascular y Respiratorio, Neoplasia o Inmunodepresión, Diabetes Mellitus, Insuficiencia Renal, Enfermedad Hepática, dependencia a alcohol, tabaco u otros tóxicos y asplenia o esplenectomía. También fue registrado el diagnóstico y la evolución del proceso. En los exitus, se registraron el número de días transcurridos desde el inicio del proceso hasta el fallecimiento.

Los datos epidemiológicos registrados para cada paciente fueron la fecha de recepción de la muestra, su edad, sexo y el servicio hospitalario de procedencia.

En cuanto a los datos microbiológicos, fueron estudiados los resultados de sensibilidad a antibióticos en todas las cepas de *S. pneumoniae* aisladas en hemocultivos y líquidos biológicos en el periodo mencionado anteriormente. Además, se registró el resultado de antigenuria de neumococo en los casos en los que constaba dicha petición.

4. RESULTADOS

Durante los años 2013-2016 se estudiaron en el laboratorio de Microbiología de nuestro hospital 76 muestras representativas de enfermedad neumocócica invasiva. Se aisló *S. pneumoniae* en 66 hemocultivos (86,84%), 6 en líquido cefalorraquídeo (7,90%) y 4 aislamientos que corresponden a líquido articular, bilis, absceso subfrénico y absceso hepático.

S. pneumoniae fue el agente causal del 2,74% (66/2407) de las bacteriemias y el 20,69% (6/29) de las meningitis de nuestro hospital durante el periodo de estudio.

Las 76 muestras en las que se aisló *S. pneumoniae*, correspondían a 72 pacientes, 37 hombres (51,39%) y 35 mujeres (48,61%). Todas las muestras procedían de Servicios de hospitalización, siendo la mayoría del Servicio de Urgencias (71,05%). De los cultivos obtenidos a partir de las 76 muestras, se realizaron test de sensibilidad a antimicrobianos por microdilución, además de antibiograma disco-placa en 3 de ellas.

A continuación, se describen las características epidemiológicas y clínicas de estos pacientes que constituyen factores de riesgo para infección por *S. pneumoniae*. (ver tabla 1, página 17).

Los antecedentes de enfermedad cardiovascular y/o respiratoria fueron los factores de riesgo más prevalentes, presentes en 42 de los pacientes (58,33%). 21 (29,17%) de los 72 enfermos tenían antecedentes de neoplasia o inmunodepresión. 13 pacientes (18,06%) presentaban Diabetes Mellitus. Se halló insuficiencia renal en 7 pacientes (9,72%) y enfermedad hepática en 5 (6,94%). En cuanto a la dependencia, había 12 casos registrados (16,67%). No existían antecedentes de asplenia o esplenectomía. En cuanto a la antigenuria, fue solicitada en 48 pacientes, de los cuales el resultado fue positivo en 34 de ellos (70,83%) y negativo en 14 (29,17%). No se realizó en 24 de los pacientes (33,33%), ya que la prueba no fue solicitada. En lo referente al foco de ENI, 46 de los 72 pacientes (63,89%) presentaban un foco respiratorio siendo neumonía confirmada en la mayoría de

ellos. 8 presentaban un foco meníngeo (11,11%), 6 acudieron con un síndrome febril sin foco aparente (8,33%) y en el 16,67% restante se diagnosticaron focos de diversa índole. Finalmente, 13 pacientes (18,06%) fallecieron; 7 de los exitus se produjeron antes de la primera semana, 4 de ellos en las primeras 72 horas (30,77%).

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

P	MUE	SERV	SX	ED	C/R	Neo/ID	DM	IR	EH	DEP	ESP	Ag	Dº	EX
1	HEM	URG	F	84	X	X		X				P	MENINGITIS	2 D
	LCR	MI												
2	HEM	ONCO	M	64	X			X				NO	CA PULMÓN	NO
3	HEM	URG	F	6 M								NO	FIEBRE	NO
4	HEM	URG	M	44	X		X					P	MENINGITIS	NO
5	HEM	URG	F	48		X				X		P	NEUMONIA	NO
6	HEM	URG	M	71	X							N	NEUMONIA	NO
7	HEM	UCI M	M	75	X							P	SDRA	5 D
8	HEM	URG	M	45	X							P	NEUMONIA	NO
9	HEM	URG	M	79	X							N	NEUMONIA	NO
10	HEM	URG	M	78	X		X					P	NEUMONIA	NO
11	HEM	DIAL	M	76		X		X				NO	FIEBRE	NO
12	HEM	URG	F	86	X							NO	I RESPIRATORIA	NO
13	HEM	URG	M	93	X							P	NEUMONIA	NO
14	HEM	URG	F	94	X		X					NO	I RESPIRATORIA	NO
15	LCR	URG	F	51	X							P	MENINGITIS	NO
16	HEM	HEM	M	32		X						P	NEUMONIA	NO
17	HEM	URG	F	57	X					X		P	NEUMONIA	NO
18	HEM	URG	F	83	X							NO	NEUMONIA	NO
19	HEM	URG	M	86	X							NO	SHOCK SÉPTICO	6 D
20	HEM	URG	F	82	X							P	NEUMONIA	NO
21	HEM	PED	M	2								NO	FIEBRE	NO
22	HEM	URG	F	45	X							P	NEUMONIA	NO
23	HEM	URG	F	25								P	FIEBRE	NO
24	HEM	URG	F	85			X					NO	I RESPIRATORIA	NO
25	HEM	URG	M	78	X	X						NO	I RESPIRATORIA	NO
26	HEM	URG	M	78	X							NO	ARTRITIS SÉPTICA	NO
	LART													
27	HEM	URG	F	48	X	X		X				NO	TROMBOFLEBITIS	NO
28	HEM	NEUMO	M	82	X	X				X		NO	NEUMONIA	NO
29	HEM	URG	F	83	X							N	NEUMONIA	NO
30	HEM	UCI M	F	83	X	X	X					P	NEUMONIA	37 D
31	HEM	URG	M	70						X		N	NEUMONIA	NO
32	HEM	URG	F	81	X	X	X					P	NEUMONIA	NO
33	HEM	URG	F	3								P	NEUMONIA	NO
34	HEM	PED	M	9M								NO	FIEBRE	NO
35	HEM	URG	F	52						X		P	NEUMONIA	NO
36	HEM	URG	F	88	X	X	X					NO	NEUMONIA	1 D
37	HEM	URG	M	77								P	NEUMONIA	NO
38	Bilis	H SEM	F	68					X			NO	COLANGITIS	NO
	HEM													
39	HEM	URG	F	77	X		X			X		NO	NEUMONIA	NO
40	Abs H	RX IV	F	71					X			NO	PANCREATITIS	NO
41	HEM	URG	M	70	X		X					N	NEUMONIA	NO
42	HEM	INF	M	83	X					X		N	NEUMONIA	NO
43	Abs S	UCI Q	M	63								NO	PERITONITIS	NO
44	HEM	URG	M	81	X	X		X		X		N	NEUMONIA	NO
45	HEM	URG	M	46					X			P	MENINGITIS	NO
	LCR													
46	HEM	URG	F	61	X	X						NO	DESCONOCIDO	NO
47	HEM	URG	F	2M								N	FIEBRE	NO
48	HEM	URG	F	60								P	NEUMONIA	NO
49	HEM	UCI M	F	61	X							P	NEUMONIA	NO
50	HEM	URG	M	54		X			X			P	NEUMONIA	6 D
51	HEM	URG	F	2								P	NEUMONIA	NO
52	HEM	URG	M	42	X					X		N	NEUMONIA	NO

53	HEM	URG	M	43							P	MENINGITIS	NO
54	HEM	URG	M	87	X						P	NEUMONIA	NO
55	HEM	URG	M	65	X		X				NO	NEUMONIA	12 D
56	LCR	UCI M	F	41							P	MENINGITIS	3 D
57	LCR	MI	F	83							P	MENINGITIS	19 D
58	HEM	URG	M	82	X						P	NEUMONIA	NO
59	HEM	UCI M	M	68		X		X	X		NO	NEUMONIA/CA	20 D
60	HEM	URG	F	91	X	X					P	NEUMONIA	NO
61	HEM	URG	M	62	X	X		X			P	NEUMONIA	9 D
62	HEM	URG	M	6M							NO	CELULITIS OD	NO
63	HEM	HEM	M	74	X	X	X			X	N	I RESPIRATORIA	13 D
64	HEM	URG	F	39							P	NEUMONIA	NO
65	HEM	URG	F	38		X		X			P	NEUMONIA	NO
66	HEM	URG	M	90	X	X					N	NEUMONIA	NO
67	HEM	URG	F	57			X				NO	DESCONOCIDO	NO
68	HEM	MI	M	78	X						P	SHOCK SEPTICO	3 D
69	HEM	PED	F	9							N	NEUMONIA	NO
70	LCR	URG	F	61							P	MENINGITIS	NO
71	HEM	URG	M	61	X	X					N	NEUMONIA	NO
72	HEM	HEM	M	68	X	X	X			X	N	I RESPIRATORIA	NO

P: Paciente; MUE: Muestra; SERV: Servicio, SX: Sexo; ED: Edad; C/R: Factores/Enfermedad Cardio-Respiratorios; NEO/ID: Neoplasia/Inmunodepresión; DM: Diabetes Mellitus; IR: Insuficiencia Renal; EH: Enfermedad Hepática; DEP: Dependencia; ESP: Esplenectomía, Ag: Antígeno urinario; P: Positivo; N: Negativo; NO: no petición; Dº: Diagnóstico; EX: Exitus; HEM: Hemocultivo; LCR: Líquido Cefalorraquídeo; Abs S: Absceso Subfrénico; Abs H: Absceso Hepático; LART: Líquido Articular; URG: Urgencias, MI: Medicina Interna; UCI M: Unidad de Cuidados Intensivos Médica; UCI Q: Unidad de Cuidados Intensivos Quirúrgica; PED: Pediatría; NEUMO: Neumología; ONCO: Oncología; H SEM: hospital de semana; RX IV: Radiología intervencionista; INF: Infecciosas; DIAL: Diálisis; HEM: Hematología; SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto; D: días

A continuación, se describen con detalle los 4 pacientes con enfermedad neumocócica invasiva que fallecieron en las primeras 72 horas (ver tabla 1).

La paciente N° 1 era una mujer de 81 años con antecedentes personales de inmunodeficiencia común variable que ingresa el 17/03/2015 en el Servicio de Urgencias por fiebre y crisis convulsiva. Ante la sospecha de sepsis se realizaron hemocultivos, antigenuria y punción lumbar, con resultado positivo, diagnosticándole así de Meningitis y bacteriemia por *S. pneumoniae*. Se le pautó tratamiento ATB con meropenem, linezolid y ampicilina. Tras las primeras horas mejoró el nivel de conciencia pero posteriormente disminuyó este con abundantes ruidos respiratorios en situación de insuficiencia cardíaca, produciéndose el exitus 48 horas después, el 19/03/2015.

La paciente 36, una mujer de 88 años institucionalizada en Residencia, con antecedentes ACxFA, doble lesión mitral reumática, dilatación de AI, cardiopatía isquémica crónica, DM2, intervenida de carcinoma de mama en 2008, acude a Urgencias con disnea el 28/03/2016 e ingresa en Medicina Interna en situación de gravedad extrema, con acidosis metabólica y foco neumónico en Rx de tórax. En

consenso con la familia se decide limitación de esfuerzo terapéutico y la paciente fallece ese mismo día.

El paciente N° 56 se trata de una mujer de 41 años sin antecedentes de interés que es atendida en domicilio por el 061 por episodio de agitación y desorientación, precisando sedación. Refiere inmersión de submarinismo 3 días antes con episodio de otalgia tratada ambulatoriamente con antibioterapia tópica. A su llegada a urgencias el 26/08/2014 se objetiva bajo nivel de conciencia y fiebre. Se realizó punción lumbar y antigenuria, siendo ambas positivas a *S. pneumoniae*. La evolución es tórpida, falleciendo a las 72 horas en UCI.

El paciente N° 68 es un varón de 68 años portador de marcapasos, parcialmente dependiente e institucionalizado. Ingresó procedente de Urgencias por fiebre y agitación psicomotriz. Infección respiratoria un mes antes de este episodio. Datos clínicos y analíticos de shock séptico, se extraen hemocultivos y se realiza antigenuria, resultando ambos positivos para *S. pneumoniae*. Se pautó meropenem y su evolución fue desfavorable falleciendo a las 72 horas de su ingreso.

Respecto a la sensibilidad antibiótica, el 13,16% (10/76) de las cepas presentaban resistencia de alto nivel a penicilina y el 25,03% sensibilidad disminuida (19/76); el 34,21% (26/76) de las muestras fueron resistentes a eritromicina y el 27,63% (21/76) lo fueron a clindamicina; la resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol fue del 32,89% (25/76); el 25% de las cepas (19/76) mostraron resistencia a tetracicinas; el 5,26% (4/76) de las muestras fueron resistentes a levofloxacino; la resistencia a cefotaxima fue de 1,32% (1/76). Finalmente, ninguna de las cepas presentó resistencia a meropenem ni a vancomicina.

A continuación, se describe la sensibilidad antibiótica en los aislamientos de *S. pneumoniae* (ver tabla 2, página 20).

TABLA 2. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS AISLAMIENTOS DE *Streptococcus pneumoniae* EN HEMOCULTIVOS Y LÍQUIDOS BIOLÓGICOS (2013-2016)

P	Muestra	Fecha	ANTIBIÓTICOS																	
			PEN		CTX		MER		ERI		CC		LVX		VA		TET		SXT	
			CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*	CIM	I*
1	HEM	17/03/15		R							R					R		R		
	LCR	18/03/15		R		S			R		R			S		R		R		
2	HEM	17/03/15		S					S		S			S		S		S		
3	HEM	30/06/14	0.12	I	≤0.25	S		S	>0.5	R	>0.5	R	>0.5	S	0.5	S	>4	≤0.25/4.7	S	
4	HEM	04/04/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
5	HEM	20/12/13	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	≤0.12	S	>4	R	≤0.25/4.7	S
6	HEM	20/02/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
7	HEM	26/12/15	0.5	I	0.5	S	0.12	S	>0.5	R	0.12	S	1	S	0.5	S	>4	R	>2/38	R
8	HEM	27/06/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	>4	R	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
9	HEM	26/03/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
10	HEM	04/02/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
11	HEM	07/10/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
12	HEM	07/04/15	0.12	I	≤0.25	S	0.25	S	0.5	I	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	1	S	>2/38	R
13	HEM	03/03/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
14	HEM	09/03/16	0.12	I	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	0.25	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
15	LCR	18/04/15	≤0.03	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.12	S	1	S	0.5	S			>2/38	R
16	HEM	24/11/14	2	I	1	I	0.5	S	>0.5	R	>0.5	R	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
17	HEM	22/04/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
18	HEM	10/02/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
19	HEM	13/05/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
20	HEM	26/01/15	≤0.03	S	0.5	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.25	S	0.5/9.5	S
21	HEM	18/10/13	4	R	1	I	0.5	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
22	HEM	09/10/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
23	HEM	29/08/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
24	HEM	10/11/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
25	HEM	21/02/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	0.5	R	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
26	HEM	04/04/15	0.12	I	≤0.12	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	≤0.25/4.7	S
	LART		0.12	I	≤0.06	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	≤0.25/4.7	S
27	HEM	30/09/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
28	HEM	18/01/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
29	HEM	02/12/13	2	I	1	I	0.5	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	>2/38	R
30	HEM	10/12/13	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
31	HEM	02/10/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.5	S	>4	R	>2/38	R
32	HEM	20/10/14	4	R	1	I	0.5	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.5	S	>4	R	>2/38	R
33	HEM	17/03/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	≤0.12	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
34	HEM	02/10/15	1	I	0.5	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S		S	≤0.12	S			>2/38	R
35	HEM	30/05/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
36	HEM	28/03/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
37	HEM	15/10/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
38	Bilis	19/05/15	0.5	I	0.5	S	0.25	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	1/19	I
	HEM	23/02/15	0.5	I	0.5	S	0.25	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	1/19	I
39	HEM	20/07/15	2	I	1	I	0.5	S	>0.5	R	>0.5	R	0.5	S	0.5	S	2	S	>2/38	R
40	ABS H	19/05/15	0.06	S	0.12	S	0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.25	S	0.25	S			1/19	I
41	HEM	21/08/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
42	HEM	08/01/15	0.12	I	≤0.25	S	0.12	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	4	I	1/19	I
43	ABS SF	23/07/15	≤0.03	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
44	HEM	26/08/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.25	S	≤0.5	S	1/19	I
45	HEM	22/09/15	0.12	R	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	1/19	I
	LCR		0.12	R	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
46	HEM	09/07/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	2	S	0.5	S	2	S	1/19	I
47	HEM	08/02/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
48	HEM	16/03/16	4	R	1	I	>0.5	S	>0.5	R	>0.5	R	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
49	HEM	20/02/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
50	HEM	10/03/16	0.12	I	≤0.25	S	0.25	S	0.25	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	2	S	2/38	I
51	HEM	24/02/15	4	R	1	I	0.5	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	>2/38	R
52	HEM	03/06/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
53	HEM	10/02/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	2	S	0.5	S	2	S	>2/38	R
54	HEM	06/11/13	≤0.03	S	≤0.25	S	0.12	S	0.12	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25	S
55	HEM	15/05/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	0.12	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	>2/38	R
56	LCR	27/08/14	≤0.03	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
57	LCR	25/01/16	2	R	0.5	S	0.5	I	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
58	HEM	19/10/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	≤0.12	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
59	HEM	29/07/13	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	>4	R	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
60	HEM	01/02/16	4	R	2	R	0.38	S	>0.5	R	>0.5	R	1	S	0.25	S	>4	R	>2/38	R
61	HEM	26/10/15	0.06	S	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	0.25	S	0.5	S	0.25	S	>4	R	0.5/9.5	S
62	HEM	31/01/15	0.12	I	≤0.25	S	0.25	S	>0.5	R	≤0.06	S	>4	R	0.25	S	>4	R	1/19	I
63	HEM	12/05/16	1	I	0.5	S	0.5	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.5	S	≤0.5	S	>2/38	R
64	HEM	24/01/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	1	S	>4	R	>2/38	R
65	HEM	14/01/14	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.25	S	0.5	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S
66	HEM	23/02/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
67	HEM	26/01/15	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	1	S	0.25	S	≤0.5	S	≤0.25/4.7	S

68	HEM	01/07/14	2	I	1	I	0.5	S	>0.5	R	0.12	S	0.5	S	0.5	S	>4	R	≤0.25/4.7	S
69	HEM	04/01/16	≤0.03	S	≤0.25	S	≤0.06	S	≤0.06	S	≤0.06	S	0.5	S	0.25	S	≤0.5	S	0.25/4.7	S
70	LCR	13/06/15	≤0.03	S	≤0.06	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	>4	R	1	S			>2/38	R
71	HEM	13/05/14	2	I	1	I	>0.5		>0.5	R	>0.5	R	0.5	S	0.5	S	>4	R	>2/38	R
72	HEM	10/03/14	0.25	I	≤0.25	S	≤0.06	S	>0.5	R	>0.5	R	0.5	S	0.5	S	>4	R	≤0.25/4.7	S

P: Paciente; **HEM:** hemocultivo; **LCR:** Líquido cefalorraquídeo; **ABS H:** absceso hepático; **ABS SF:** absceso subfrénico; **LART:** líquido articular; **CIM:** concentración mínima inhibitoria; **I*:** Interpretación; **I:** Intermedio; **R:** Resistente; **S:** Sensible; **PEN:** Penicilina; **CTX:** Cefotaxima; **MER:** Meropenem; **ERI:** Eritromicina; **CC:** Clindamicina; **LVX:** Levofloxacino; **VA:** Vancomicina; **TET:**Tetraciclinas; **SXT:** Trimetoprim/Sulfametoxazol

5. DISCUSIÓN

Los dos primeros objetivos de nuestro estudio eran conocer la epidemiología de la ENI y analizar las características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de *S. pneumoniae* en nuestra área de salud.

S. pneumoniae representa sólo el 2,74% de las bacteriemias, sin embargo, ha sido el agente causal más frecuente de meningitis [20,69% (6/29)] en nuestro medio en el periodo de estudio. Respecto al foco de origen de infección neumocócica invasiva, el foco respiratorio, principalmente el cuadro neumónico, continúa siendo el más frecuente, en un 63,89% de los casos^{2, 4, 5, 8, 9}. El foco meníngeo, observado en el 11% de los pacientes de nuestro estudio, es ligeramente superior (4-9%)⁸.

En nuestro estudio, la mortalidad por ENI fue de un 18,06%, dato que concuerda con el 5-26% hallado en la bibliografía revisada^{4, 5, 6, 8, 17, 18}. No se produjeron muertes en menores de 2 años y, la mayoría (9 de los 13 casos), se produjo en la población más susceptible al desarrollo de sepsis neumocócica, es decir, los mayores de 65 años (69,23%), frente a las 4 producidas en pacientes con edades comprendidas entre los 2 y los 65 años (30,77%). Además, la mortalidad ha sido mayor en hombres que en mujeres (8 casos frente a 5), cuando la distribución por sexos era prácticamente la misma. Nuestros datos revelan que la mayoría de muertes se produjeron por neumonía o infección respiratoria (53,85%), seguido de meningitis en un 23,08% de los casos, correspondiendo el 23,08% restante (3 muertes) a distintas causas. Es importante aclarar que, en proporción, la principal causa de muerte corresponde al foco meníngeo, con un 37,5% de muertes, frente al 15,22% debidas a neumonía. Hasta aquí, puede afirmarse que nuestro estudio ha obtenido resultados similares a los encontrados en la bibliografía consultada^{3, 4, 5, 8, 17}, con la excepción, quizás, del artículo de “Christensen JS et al”, en el que el origen meníngeo de ENI no puede catalogarse como el que peor pronóstico presenta.

La mayoría de los fallecidos presentaron, al menos, 2 factores de riesgo para el desarrollo de ENI y solo en 2 de los 13 fallecidos (15,38%) no se registró ninguno. Así, 9 de los 13 exitus (69,23%) presentaban factores de riesgo cardio-respiratorios. Un 53,85% de los fallecidos (7/13) tenían antecedentes de inmunodepresión o

neoplasia. 4 de los fallecidos tenían Diabetes Mellitus (DM) y en todos ellos había factores cardio-respiratorios asociados. Asimismo, se encontró Insuficiencia renal (IR) en un 15,38% de los exitus (2/13), cifras que se repiten en pacientes fallecidos con antecedentes de Enfermedad Hepática (EH) y en pacientes con dependencia. No se hallaron antecedentes de asplenia o esplenectomía. Creemos que existe una falta de información en el registro de algunos datos, como los hábitos enólico, tabáquico o consumo de otros tóxicos y sobre vacunación previa. Consideramos que debería reflejarse en toda historia clínica si se ha preguntado sobre ello, tanto si la respuesta es positiva como negativa. Lo mismo sucede con la anotación del tiempo exacto transcurrido desde el ingreso y diagnóstico de ENI hasta la instauración de un tratamiento antibiótico empírico, dada la importancia de su inicio en las primeras 4 horas de cara al pronóstico ⁶. Todos estos datos, son muy importantes para realizar una correcta valoración clínica y epidemiológica de la ENI.

Como ya se ha comentado, a pesar de que con el desarrollo de vacunas polisacáridas ha ido aumentando progresivamente la cobertura serotípica y con ello disminuyendo globalmente la incidencia de ENI por estas cepas tanto por protección directa como indirecta, se está produciendo paralelamente un incremento de ENI por serotipos no incluidos en ellas, a lo que se suman la variabilidad geográfica de su distribución, los más de 95 serotipos neumocócicos existentes y su constante mutación. Por ello, es fundamental el desarrollo de vacunas híbridas, que combinen la diana terapéutica actual (cápsula polisacárida) con otras como pueden ser proteínas neumocócicas presentes tanto en cepas encapsuladas como en no encapsuladas ^{1, 2, 3, 9, 20}. Sería recomendable conocer los serotipos circulantes en nuestro área de salud, ya que actualmente no disponemos de los medios para ello, siendo necesario su envío al Centro Nacional de Microbiología (CNM) ³⁰.

En cuanto a la sensibilidad antimicrobiana de *S. pneumoniae* en nuestro estudio, hallamos un 13% de resistencia de alto nivel a penicilina y un 23% de sensibilidad disminuía, resultados ligeramente menores al 19% de resistencia de alto nivel descrita en Murcia ³² y mayores del 7,7% observado en un hospital de Navarra ³¹. Por otra parte, encontramos un 34,21% de resistencias a eritromicina, resultado similar al 38,8% observado en el estudio navarro ³¹ y menor del 52% en el "Hospital Virgen de la Arrixaca" ³². En lo que se refiere al

Trimetoprim/sulfametoxazol, se encontró una resistencia de casi un 33%, porcentaje superior al 25% de Navarra ³¹. Estas diferencias podrían explicarse por la variabilidad geográfica que presenta *S. pneumoniae*. Lo mismo ocurre con las tetraciclinas, presentando las cepas de nuestro estudio una resistencia del 25% frente al 20% esperado ³¹. En lo que se refiere a la clindamicina, se halló una resistencia de aproximadamente un 28%, resultado que contrasta con el 49% observado en el estudio murciano ³². Obtuvimos resistencias a levofloxacin en un 5,26% de las muestras, frente al 3% habitual ^{31, 32}, y solo un 1,32% de nuestras cepas fueron resistentes a cefotaxima, lo que concuerda con la resistencia habitual en España (<5%) y que hace que este fármaco sea una buena opción terapéutica. Es importante reseñar que las cepas que presentan resistencia a algún antimicrobiano, acaban desarrollando otras resistencias y, por tanto, convirtiéndose en gérmenes multirresistentes ^{31, 32}. Finalmente, ninguna de las cepas presentó resistencia a meropenem ni a vancomicina, si bien es cierto que se han descrito resistencias al primero ^{3, 9}.

El progresivo aumento de resistencias antibióticas por parte del neumococo hacia penicilina y la aparición reciente de resistencias a cefalosporinas de tercera generación, junto a los altos porcentajes de resistencia a tetraciclinas, macrólidos, Trimetoprim/Sulfametoxazol y clindamicina entre otros, hacen que sea fundamental mantener una vigilancia activa para establecer el tratamiento antibiótico empírico más adecuado ^{6, 31, 32}.

Es cierto que la mortalidad y la incidencia global de ENI ha disminuido principalmente debido a la introducción de vacunas conjugadas ⁵ pero, a pesar de un diagnóstico cada vez más precoz, y de un tratamiento adecuado, además de una mejora de los cuidados intensivos, aún queda mucho progreso por hacer para reducir la morbi-mortalidad que este germen produce ^{6, 9}.

6. CONCLUSIONES

1. Existen numerosos factores de virulencia por parte de *S. pneumoniae* y múltiples factores de riesgo de los pacientes que predisponen al desarrollo de enfermedad neumocócica invasiva.
2. Una edad igual o mayor de 65 años, el sexo masculino, y comorbilidades de base como las enfermedades cardio-respiratorias, Diabetes Mellitus, antecedentes de neoplasia o inmunodepresión, enfermedades crónicas renales y hepáticas, además de la dependencia a tóxicos, conllevan un peor pronóstico de la enfermedad neumocócica invasiva. La mayoría de nuestros pacientes presentaban al menos 2 de estos factores de riesgo.
3. La mortalidad a causa de enfermedad neumocócica invasiva sigue siendo elevada, sobre todo en las primeras 72 horas.
4. El foco primario principal de ENI fue respiratorio seguido del meníngeo, sin embargo, el segundo resultó ser el cuadro más letal. Además, *S. pneumoniae* representa el primer agente causal de meningitis en nuestro medio.
5. *S. pneumoniae* presenta crecientes resistencias antibióticas, cada vez mayores en macrólidos, tetraciclinas, lincosamidas, cotrimoxazol, quinolonas y beta-lactámicos.
6. Cefotaxima y meropenem continúan siendo buenas opciones terapéuticas.
7. No se han detectado resistencias a vancomicina.
8. Creemos conveniente el envío de las cepas de *S. pneumoniae* causantes de ENI al Centro Nacional de Microbiología (CNM) para su tipificación, de manera que puedan conocerse la distribución serotípica comunitaria, así como el posible reemplazo en el tiempo, con el objeto de establecer las medidas de prevención y control oportunas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Keller LE, Robinson DA, McDaniel LS. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *MBio* [Internet]. 2016 Mar 22 [cited 2017 Mar 21];7(2):e01792. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006456>
2. Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL, et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2012 Jul 9 [cited 2017 Mar 21];11(7):841–55. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.53>
3. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2017 Mar 21];3(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818515>
4. Kalin M, Örtqvist Å, Almela M, Aufwerber E, Dwyer R, Henriques B, et al. Prospective Study of Prognostic Factors in Community-Acquired Bacteremic Pneumococcal Disease in 5 Countries. *J Infect Dis* [Internet]. 2000 Sep [cited 2017 Mar 28];182(3):840–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950779>
5. Drijkoningen JJC, Rohde GGU, Florentiis D De, Martini M, Icardi G, Group E. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 May [cited 2017 Mar 28];20 Suppl 5:45–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313448>
6. Garnacho-Montero J, García-Cabrera E, Diaz-Martín A, Lepe-Jiménez JA, Iraurgi-Arcarazo P, Jiménez-Álvarez R, et al. Determinants of outcome in patients with bacteraemic pneumococcal pneumonia: Importance of early adequate treatment. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2010 Jan 19 [cited 2017 Mar 28];42(3):185–92. Available from:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365540903418522>

7. Cobo J, Miquel R, Rojo P, Rodríguez J, Miguel B, Lletí S. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías clínicas SEIMC [Internet]. 2006 [cited 2017 Mar 16]; Available from: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/guiasclinicas/seimc-GuiaClinica4_2006_Bacteriemia.pdf
8. Christensen JS, Jensen TG, Kolmos HJ, Pedersen C, Lassen A. Bacteremia with *Streptococcus pneumoniae*: sepsis and other risk factors for 30-day mortality—a hospital-based cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012 Oct 13 [cited 2017 Mar 16];31(10):2719–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581362>
9. Feldman C, Anderson R. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. *F1000Research* [Internet]. 2016 Sep 14 [cited 2017 Apr 29];5:2320. Available from: <http://f1000research.com/articles/5-2320/v1>
10. Prado Jiménez V. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infect* [Internet]. 2001 [cited 2017 May 4];18:6–9. Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v18s1/art02.pdf>
11. Montes M, García-Arenzana J. PROGRAMA DE CONTROL EXTERNO DE CALIDAD SEIMC, AÑO 2006 Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. [cited 2017 Mar 16]; Available from: <http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2006-bacteriologia1.pdf>
12. Martínez Chamorro M. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad neumocócica: utilidad del test rápido de detección de antígeno neumocócico en orina en pediatría. *AEP* [Internet]. 2014 [cited 2017 May 5]; Available from: <https://www.aepap.org/sites/default/files/diag.nmc3.pdf>
13. van Prehn J, van Veen SQ, Schelfaut JJG, Wessels E. MALDI-TOF mass

- spectrometry for differentiation between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016 [cited 2017 May 3];85(1):9–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889316000316>
14. Jensen TG, Konradsen HB, Bruun B. Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 1999 Jul [cited 2017 May 5];5(7):417–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14637575>
 15. Smith MD, Sheppard CL, Hogan A, Harrison TG, Dance DAB, Derrington P, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Mar 28];47(4):1046–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225103>
 16. Lammers AJ, de Porto AP, Florquin S, de Boer OJ, Bootsma HJ, Hermans PW, et al. Enhanced vulnerability for *Streptococcus pneumoniae* sepsis during asplenia is determined by the bacterial capsule. *Immunobiology* [Internet]. 2011 Aug [cited 2017 Mar 16];216(8):863–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298511000441>
 17. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lambertsen L, et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med* [Internet]. 2009 May 26 [cited 2017 Apr 3];6(5):e1000081. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19468297>
 18. 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* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2017 Apr 3];45(1):46–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554699>

19. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* [Internet]. 2000 Oct [cited 2017 Apr 30];68(10):5690–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992472>
20. Grau I, Ardanuy C, Cubero M, Benitez MA, Liñares J, Pallares R. Declining mortality from adult pneumococcal infections linked to children’s vaccination. *J Infect* [Internet]. 2016 Apr [cited 2017 May 1];72(4):439–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445316000281>
21. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Fraser D. Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2003 Jun [cited 2017 May 1];22(6):532–40. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0006454-200306000-00009>
22. Talbot TR, Poehling KA, Hartert T V., Arbogast PG, Halasa NB, Ed M, et al. Reduction in High Rates of Antibiotic-Nonsusceptible Invasive Pneumococcal Disease in Tennessee after Introduction of the Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2017 May 1];39(5):641–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/422653>
23. Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. Guía de terapéutica antimicrobiana. 26th ed. ANTARES; 2016. pág 454, 624-629, 635-639.
24. Marrie TJ, Tyrrell GJ, Garg S, Vanderkooi OG. Factors predicting mortality in invasive pneumococcal disease in adults in Alberta. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2011 May [cited 2017 May 1];90(3):171–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0005792-201105000-00003>

25. Letona S. et al (Equipo PROA HCUZ) Guía de tratamiento antimicrobiano PROA del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza HCUZ. <http://10.35.208.91:16080/guia-de-tratamiento-antimicrobiano-hcuz>
26. Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñiz MC, et al. Identificación bacteriana mediante espectrofotometría de masas *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2010;28(8):492–497.
27. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chilena Infectol*, 2013;30(2):140-146.
28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints version 5.0. 2015. www.eucast.org/clinical_breakpoints/
29. , García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Procedimientos en Microbiología clínica: 11. Métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. (2000). www.seimc-org/documentos/protocolos/microbiología
30. Enfermedad Invasiva por Neumococo en Aragón 2000-2015. Semana 18/2016. Boletín Epidemiológico Semanal de Aragón. Disponible en: <http://www.aragon.es/vigilanciaepidemiologica>
31. García-Irure JJ, Navascués A, Martín I, Gastesi C. Resistencia a penicilina y otros antimicrobianos en 103 aislamientos clínicos de *Streptococcus pneumoniae* (2000-2001). *ANALES Sis San Navarra*, 2003; 26 (1): 27-33.

32. Ruiz J, Simarro E, Gómez J. Resistencias y tratamiento de *Streptococcus pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 191-195.