

---

Tesis doctoral

PNEUMÒNIA AGUDA DE LA COMUNITAT EN L'ADULT:  
Etiologia i biomarcadors genètics de l'hoste

Anna San Gil Betriu

---



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



# TESI DOCTORAL

---

PNEUMÒNIA AGUDA DE LA COMUNITAT EN L'ADULT:  
Etiologia i biomarcadors genètics de l'hoste

**Anna San Gil Betriu**  
**Abril 2017**





FACULTAT DE MEDICINA - UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA

Programa de Doctorat de Medicina

Tesi doctoral presentada per Anna San Gil Betriu per optar al títol de doctora per la  
Universitat Internacional de Catalunya

Directora

Dra. Esther Calbo Sebastian

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Esther Calbo Sebastian a

l'Hospital Universitari Mútua Terrassa - Departament de Medicina Interna



**Al Jose, el Xavi i la Carla:  
sense vosaltres res de tot això té sentit.**



## FINANÇAMENT

Ministeri d'Economia i Competitivitat, Institut de Salut Carlos III per a la Investigació Biomèdica. INVESTIGACIÓN DE BIOMARCADORES GENÉTICOS EN EL HUÉSPED RELACIONADOS CON EL RIESGO DE ENFERMEDAD INVASORA NEUMOCÓCICA (referència: PI11/02698).





## AGRAÏMENTS

Una tasca com aquesta no pot ser el treball d'una sola persona. Primer de tot, gràcies tant al Jose com a l'Esther, perquè sempre heu confiat en mi, fins i tot més que jo mateixa, i en el fet que podria assolir aquesta fita.

En segon lloc, gràcies, Xavi i Carla, he après tantíssim de vosaltres... La vida té una altra perspectiva vista amb vosaltres.

Gràcies també a l'esplèndid servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Mútua Terrassa; Mariona, Eva i Pepa, sou magnífiques.

Gràcies a tot l'equip de control d'infecció de l'Hospital: Montse, Olga, Mamen i Núria, impossible tota aquesta feina sense vosaltres. Gràcies, Cris i Conxi, «por esa letra Calibri».

Gràcies al Servei de Medicina Interna del Hospital. Mónica, te agradezco tu paciencia infinita con mi pésima estadística; Dr. de la Sierra, gràcies per donar solidesa a aquesta feina, no sempre prou valorada; gràcies, Txell, Pere, Mireia i Lucia. També, gràcies, Queralt, Xavi, Lucia B., Joan, Cris i Vero. Gracias, Dr. Garau, sin ti mi conocimiento de pneumococo no sería el mismo. I gràcies a tots els col·laboradors dels estudis, en especial a la Dra. Maria Jesús Arranz i a la Dra. Viladot.

Gràcies de tot cor a tots els residents de l'Hospital i a tots els estudiants de la UIC. Les vostres preguntes, la il·lusió i les ganes infinites d'aprendre són el motor de la recerca. Per acabar, i no menys important, gràcies a tota la meva família, en especial a la meva mare, pels valors que m'ha transmès: la importància del treball, la perseverança i el fet de mantenir sempre la il·lusió.



## ÍNDEX

ABREVIACIONS .....	11
INTRODUCCIÓ .....	13
JUSTIFICACIÓ .....	31
HIPÒTESIS .....	33
OBJECTIUS .....	35
ARTICLES.....	37
RESUM DELS RESULTATS .....	73
DISCUSSIÓ .....	77
CONCLUSIONS .....	87
REFERÈNCIES .....	89



## ABREVIACIONS

ACIP:	Advisory Committee on Immunization Practice
ATS	American Thoracic Society
CLSI:	Clinical and Laboratory Standard Institute
DNA:	Àcid Desoxiribonucleic
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDA:	Food and Drug Administration
IDSA	Diseases Society of America
MPI:	Malaltia Pneumocòccica Invasora
MPOC:	Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica
NLR:	NOD-like Receptors
OMS:	Organització Mundial de la Salut
PAC:	Pneumònia Aguda de la Comunitat
PCR:	Polimerase Chain Reaction
PCV7:	Vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent
PCV10:	Vacuna antipneumocòccica conjugada 10-valent
PCV13:	Vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent
PPSV23:	Vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent
PRR:	Pattern Recognition Receptors
RLR:	RIG-I-like Receptors
RNA:	Àcid Ribonucleic
SARS:	Severe Acute Respiratory Syndrome
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
TLR:	Toll-like Receptors
VIH:	Virus d'Immunodeficiència Humana
VRS:	Virus Respiratori Sincicial



## INTRODUCCIÓ

La pneumònia és un procés infecciós del parènquima pulmonar produït per la proliferació de microorganismes a l'interior dels alvèols, que provoquen una resposta inflamatòria i una lesió dels teixits. La clínica de la pneumònia ja va ser ja descrita per Hipòcrates (c. 460 a. de C. - 370 a. de C.), qui en va observar els símptomes bàsics, com la febre aguda, el dolor costal, la respiració curta i ràpida, el pols accelerat i la tos (1). Avui en dia no hi ha dubtes respecte a la síndrome clínica, però sí que persisteix la discussió sobre quins són els principals agents etiològics, quin pes té cadascun d'aquests, com han evolucionat en el temps i quina és la població diana amb més factors de risc per contreure-la.

La pneumònia adquirida en la comunitat és la causa més freqüent d'ingrés hospitalari i de mortalitat de causa infecciosa en el nostre medi. Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), s'estima que es diagnostiquen, aproximadament, 450 milions de casos de pneumònia cada any. Es calcula que moren uns 4 milions de persones l'any, xifra que significa un 7 % de la mortalitat global (2).

### **1. Etiologia de la pneumònia aguda de la comunitat**

Malgrat els avenços produïts en les darreres dècades amb les tècniques de diagnòstic microbiològic, podem afirmar que aproximadament en la meitat dels casos de pneumònia aguda de la comunitat (PAC) no arribem a conèixer-ne l'etiologia (3, 4). Aquest fet representa un gran repte clínic a l'hora de decidir un tractament empíric apropiat. A fi de poder prendre decisions terapèutiques acurades, es necessiten dades sobre la freqüència relativa de cada patògen, així com de la gravetat que cadascun d'aquests pot arribar a implicar. El primer obstacle per al diagnòstic etiològic està relacionat amb l'obtenció de mostres clíniques rellevants i amb alta sensibilitat i especificitat: obtenir mostres de l'arbre bronquial inferior pot arribar a ser molt difícil, i cal tenir en compte que aconseguir diferenciar la colonització d'infecció també resulta complicat.



La principal mostra no cruenta obtinguda per al diagnòstic de la PAC és l'esput, ja que permet l'estudi de les secrecions respiratòries d'una forma simple, ràpida i econòmica. En contraposició a aquests beneficis, aquesta mostra presenta determinats desavantatges: un elevat nombre de pacients no expectora, la mostra no sempre és representativa de l'exsudat del focus inflamatori i el fet que tota mostra d'esput passa per l'orofaringe fa possible que es contami amb microbiota orofaríngia. En la valoració d'un esput descartarem les mostres que presentin més de 10 cèl·lules epitelials de descamació orofaríngia per camp i menys de 25 leucòcits polimorfonuclears per camp. La nebulització de sèrum salí hipertònic (esput induït) pot augmentar la probabilitat d'obtenir una mostra vàlida. Malgrat els desavantatges esmentats, seguim utilitzant el cultiu d'esput, atesa la seva facilitat d'obtenció i perquè un cop obtingut, si és de bona qualitat, aporta informació rellevant amb una alta especificitat, juntament amb el fet que si s'aïlla un microorganisme patogen, és possible obtenir la seva sensibilitat antibiòtica (5).

Una de les mostres microbiològiques més importants són els hemocultius. S'ha qüestionat la pràctica sistemàtica d'hemocultius en tots els pacients amb PAC, donada la seva baixa sensibilitat i l'elevat cost econòmic que representa, però hi ha consens al voltant de la seva utilitat en els pacients que requereixen ingrés hospitalari. La positivitat dels hemocultius és altament específica, per bé que té lloc en menys dels 20 % dels casos. Sabem que els hemocultius són positius en un 20-25 % dels pacients hospitalitzats per pneumònia pneumocòccica (6). Aquesta proporció és molt menor en els casos de PAC per *H. influenzae* o *P. aeruginosa*, i molt rarament en casos per *M. catarrhalis*. En la pneumònia hematògena per *S. aureus* els hemocultius són gairebé sempre positius, encara que només són positius en un 25 % dels casos, en què la inhalació o l'aspiració són les causants de la PAC (7).

En el diagnòstic de PAC, també es pot dur a terme un cultiu de mostra per punció transtoràcica aspirativa, que és una tècnica cruenta però relativament ben tolerada, amb una especificitat que pot arribar al 100 % (8).

Quant a l'obtenció de líquid pleural per al diagnòstic etiològic de la PAC, podem afirmar que és necessària l'existència d'aquest, en primer terme, i que el volum òptim

de fluid pleural ha de ser de 30 a 50 ml (9). És una tècnica altament específica, però cruenta i amb una sensibilitat baixa; en líquids pleurals no purulents és del 25 % (10). En tot cas, és imprescindible de realitzar en el cas de sospita d'empíema, per les implicacions terapèutiques.

Recentment s'han desenvolupat tècniques moleculars que detecten el DNA/RNA del bacteri o virus en mostres respiratòries. Aquestes tècniques han demostrat ser molt més sensibles que els mètodes convencionals (11). El primer pas en la implementació de noves tècniques passa per la introducció de la *Polimerase Chain Reaction* (PCR), que es basa en l'amplificació del gen present en virus o bacteris. Per tal de millorar la tècnica de la PCR, s'ha implementat la PCR en temps real, on la velocitat en el diagnòstic és més gran, ja que combina amplificació i detecció de forma simultània amb l'ús de marcadors fluorescents. A fi de facilitar la detecció dels potencials agents causants, s'han instaurat les tècniques de PCR múltiple, en les quals simultàniament es realitza cribratge de diversos virus i bacteris.

La majoria d'estudis d'etiologia de pneumònia fan ús de mostres nasofaríniques per testar la presència de virus mitjançant la PCR. L'aspirat nasofaríngic és el que en general està considerat adient per a nens, ja que proporciona tant mostres nasals com faríniques. S'han aïllat virus respiratoris en més del 95 % de les mostres obtingudes amb aquesta tècnica en nens amb infeccions respiratòries (12). Tot i així, l'obtenció d'un aspirat és molest i requereix un dispositiu de succió. En contraposició, l'obtenció de frotis nasofaríngic mitjançant cotó estèril amb una profunditat de 2-3 cm presenta una sensibilitat comparable a la de l'aspirat per al cultiu de la majoria de virus respiratoris, tret del VRS (13). En adults, el frotis nasofaríngic o transnasal té una sensibilitat major que el del frotis faríngic, però pot ser menys sensible que el rentat nasofaríngic (14). Les mostres nasofaríniques són una tècnica senzilla, no cruenta per a la realització de la PCR, per bé que novament presenta la important limitació que la troballa d'un virus en la mostra respiratòria alta pot deure's tant a la coexistència d'una colonització de via aèria alta com al fet que és el patògen causant de la PAC.

La broncoscòpia amb raspall bronquial és un sistema que consta d'un doble catèter telescòpic amb un raspall intern i oclusió distal mitjançant un tap de polietilenglicol

que permet recollir mostres respiratòries distals no contaminades. Amb aquesta mostra es pot realitzar tant cultiu com tècniques de PCR; la sensibilitat oscil·la entre un 65 % i un 100 % i l'especificitat, entre un 70 % i un 100 %.

Disposem també de les tècniques immunològiques, o *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), per a la detecció d'antigen polisacàrid de pneumococ en orina. És una mostra fàcil d'obtenir i la tècnica és molt senzilla i ràpida. Es pot detectar des que s'inicien els símptomes fins a diverses setmanes després. Detecta polisacàrids de la paret cel·lular del pneumococ entre un 77 % i un 88 % dels pacients amb pneumònia pneumocòccica bacterièmica, i fins en un 64 % dels pacients amb pneumònia pneumocòccica no bacterièmica, amb una especificitat elevada en l'adult, per sobre del 95 %. Té, però, una limitació, com és l'alt nombre de falsos positius en determinades poblacions: nens amb colonització nasofaríngia, pacients que hagin rebut recentment (menys 5 dies abans) la vacuna antipneumocòccica o els casos en què existeix una exacerbació bronquial causada per pneumococ en la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) (15). També comptem amb aquesta tècnica per a la detecció de la *Legionella pneumophila* serogrup I. La tècnica ELISA mitjançant antigen urinari és positiva en un 74 % dels pacients amb pneumònia causada per aquest agent etiològic, amb una especificitat de 99 % i amb un augment de la sensibilitat en quadres més greus (16).

Finalment, tenim les proves serològiques, on la sensibilitat i l'especificitat per al diagnòstic de pneumònia són variables. La utilitat d'aquestes proves per efectuar un diagnòstic ràpid és limitada, ja que sol requerir una seroconversió que no es produeix fins a setmanes després que s'hagin iniciat els símptomes, fet que comporta un diagnòstic retrospectiu (17).

El pneumococ ha estat tradicionalment reconegut com la causa més freqüent de PAC. No obstant això, en els darrers anys la seva incidència ha experimentat una caiguda considerable, fins al punt que en algunes sèries ja no és el primer agent causant de PAC (3, 18). Aquest canvi de paradigma pot ser degut a la suma de la introducció de la vacuna antipneumocòccica polisacàrida en adults fa ja més de trenta anys, de la

vacunació dels nens amb les vacunes conjugades des de l'any 2000, així com de la disminució del nombre de fumadors i de l'ampli ús d'antibiòtics (19).

Altres causes de PAC descrites inclouen *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* i altres bacils gramnegatius (20, 21). En pacients amb MPOC s'ha descrit la PAC per *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i *Pseudomonas aeruginosa*. En ocasions, alguns enterobacteris també poden causar PAC en persones que tenen MPOC o bronquièctasi, especialment en pacients que reben un tractament amb corticoides (22).

Hi ha una gran variabilitat pel que fa a la incidència de la PAC deguda a microorganismes anomenats *atípics*: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* i *Legionella pneumophila*. Aquestes diferències es deuen, en part, a les tècniques diagnòstiques utilitzades, a la població en estudi (ambulatoria, hospitalitzada) i a possibles variacions estacionals i regionals (23, 24). La incidència d'aquests patògens en la PAC confirmada varia en la literatura, des d'un 4 % si s'utilitzen mètodes PCR i antígen de de *Legionella pneumophila* serogrup 1 en orina, fins a un 10 % quan el diagnòstic s'estableix a través de la determinació de serologies i antigen. Cal tenir en compte que les serologies són lentes pel que tenen una utilitat escassa en la pràctica clínica habitual i presenten menys especificitat que els nous mètodes de PCR (3, 25).

Tradicionalment ens hem focalitzat poc en l'etiologia viral de la pneumònia. Això és conseqüència de: a) la baixa consideració que es tenia anteriorment de la capacitat patogènica dels virus (ja que es creia que calia una actuació conjunta amb altres patògens respiratoris); b) els escassos mètodes adreçats al diagnòstic d'aquesta patologia fins a l'actualitat, cars i poc accessibles, i c) els pocs tractaments específics antivirals que hi ha per tractar la PAC viral. Avui en dia, però, s'està produint un interès creixent en la potencial etiologia viral de les PAC com a conseqüència de l'emergència dels nous virus respiratoris (SARS, H5N1, H1N1, H7N5 i Mers-Cov) i de la introducció de mètodes com la PCR per a nombrosos virus, la qual millora la capacitat diagnòstica, així com la caiguda de la incidència de la pneumònia pneumocòccia (2, 26, 27).

El fet de disposar d'una gran diversitat de mostres respiratòries per a l'obtenció del diagnòstic de la PAC viral pot provocar una notable variabilitat en els resultats. Com s'ha establert prèviament, una de les claus a l'hora d'interpretar la identificació de microorganismes en mostres respiratòries és intentar distingir la colonització de la veritable infecció. Probablement, a més de permetre la selecció d'una mostra rellevant, l'obtenció d'una PCR quantitativa ens pot ajudar a diferenciar la infecció de la colonització, i, d'altra banda, la mesura simultània en el temps de controls asimptomàtics pot contribuir a clarificar aquest fet. En els estudis de cohorts la determinació de la presència de virus respiratoris en pacients amb PAC o en individus asimptomàtics ha ajudat a establir el vincle de causalitat i a identificar els virus respiratoris com a agents responsables de la PAC (28, 29). Existeixen dades que mostren una correlació entre la càrrega viral i la gravetat de la malaltia, però encara som lluny de poder definir autèntics punts de tall entre colonització i infecció. (30).

Jain *et al.* (2), als EUA, on la vacunació infantil antipneumocòccica és massiva, descriu els virus *Rhinovirus* i *Influenza* com les dues primeres causes de PAC, per davant del pneumococ. L'*Influenza* segueix sent la causa predominant viral de PAC, tot i que les guies de la Infectious Diseases Society of America (IDSA) i de l'American Thoracic Society (ATS) inclouen altres virus reconeguts comunament com a causants de pneumònia, com ara el VRS, l'adenovirus, la *parainfluenza*, el metapneumovirus, l'herpes simple, el varicel·la-zòster, el SARS i el coronavirus (31).

En la literatura recent hi ha set estudis que cal remarcar en què s'afegeixen mètodes PCR per al diagnòstic de pneumònia en l'adult, i en tots ells el fet d'afegir PCR incrementa el rendiment diagnòstic de la PAC (vegeu la taula 1). L'aïllament de virus en mostres respiratòries de pacients amb PAC oscil·la des d'un 15 % fins a un 57 % dels casos. Existeix un biaix inherent al disseny d'aquests estudis: tots menys l'estudi de Templeton *et al.* inclouen pacients que consulten a urgències de l'hospital o que hi ingressen, de manera que és probable que no tinguem descrita la patologia més lleu causant també de PAC i en la qual, possiblement, la proporció d'infeccions virals és més elevada.

Taula 1. Estudis amb diagnòstic etiològic de pneumònia afegint-hi PCR múltiple viral

	N	Diagnòstic etiològic	Aïllament de virus
Templeton <b>CID 2005 (26)</b>	105	75 %	Virus 56.2 % Coinfecció 26.5 %
Marcos <b>Antivir Ther 2006 (27)</b>	198	57 %	Virus 13 % Coinfecció 10 %
Jennings <b>Thorax 2008 (32)</b>	304	58 %	Aïllament viral 29 %
Johenstone <b>Chest 2008 (33)</b>	193	39 %	Virus 15 % Coinfecció 4 %
Johansson <b>CID 2010 (23)</b>	184	67 %	Aïllament viral 29 %
Jain <b>NEJM 2015 (3)</b>	2320	38 %	Virus 23 % Coinfecció 3 %
Gadsby <b>CID 2016 (22)</b>	323	87 %	Virus 5.4 % Coinfecció 24.6 %

Clàssicament s'ha definit la pneumònia viral com a més freqüent en adults joves, però de forma progressiva en la literatura s'ha demostrat la presència d'aquests tipus de pneumònia en pacients d'edat avançada, i fins i tot s'han descrit brots en residències geriàtriques (34, 35).

Per acabar, cal tenir en compte la possibilitat de causes no infeccioses de la síndrome clínica de la PAC, com són l'edema pulmonar, la neoplàsia pulmonar, el destret respiratori, l'infart pulmonar, la pneumònia criptogenètica, la pneumònia eosinofílica, la pneumònia aguda intersticial, la sarcoïdosi, la vasculitis, la pneumonitis química aspirativa i la toxicitat per fàrmacs, entre d'altres (36).

## 2. Evolució de la malaltia pneumocòccica invasora

L'*Streptococcus pneumoniae* continua sent responsable d'una elevada morbiditat i mortalitat a tot el món, així com la causa d'un ampli espectre de presentació clínica (pneumònia, meningitis, bacterièmia i otitis mitjana), i alhora és una de les infeccions més importants que es poden prevenir amb la vacunació. La presència de bacterièmia o de cultius positius per a *Streptococcus pneumoniae* en llocs habitualment estèrils es defineix com a Malaltia Pneumocòccica Invasora (MPI). Els nens menors de 5 anys, els pacients d'edat avançada i els pacients amb comorbiditats, particularment els immunodeprimits, són els que tenen un risc més elevat de presentar una MPI. En els països industrialitzats la incidència més baixa sempre ha estat reportada a Europa, mentre que les taxes més elevades corresponen als EUA abans de la introducció de la vacuna conjugada 7-valent (PCV7) (37).

L'*Streptococcus pneumoniae* produeix diferents factors de virulència, els quals estan implicats en el desenvolupament de la malaltia. Conèixer i entendre el funcionament d'aquests factors permetrà fer tractaments més dirigits, així com desenvolupar noves vacunes (38). Alguns d'aquests factors de virulència són: la càpsula polisacàrida, els *pilus*, la pneumolisina i algunes proteïnes de superfície. El polisacàrid capsular és el principal factor de virulència del pneumococ, degut a la capacitat que té de bloquejar el reconeixement del patogen per part del sistema immunitari de l'hoste, cosa que impedeix la fagocitosi (39). És l'estructura més externa de l'*S. pneumoniae* i té un gruix aproximat de 200-400 nm. Les diferències en l'estructura dels polisacàrids capsulars, amb un comportament antigènic diferent, han permès identificar més de 90 tipus capsulars (serotips) diferents. Alguns serotips són més freqüentment trobats en població portadora, d'altres tenen més facilitat per causar una malaltia lleu o greu i uns altres estan més relacionats amb brots (40). Tots els pacients amb MPI han estat prèviament portadors, però la durada i la prevalença del portador estan íntimament relacionades amb el tipus d'hoste (41).

L'epidemiologia dels serotips causants de la MPI és complexa i dinàmica. Fins a l'actualitat, tot i que la majoria d'estudis han fet palesa una disminució de la incidència de l'MPI (42-45), hi ha algunes publicacions que han demostrat un lleu increment de la

incidència d'aquesta en adults del nostre medi (46-48). Existeixen importants factors com ara les variacions temporals i geogràfiques de clones circulants, les diferències en les tècniques d'hemocultiu o els patrons d'hospitalització, o el consum d'antibiòtics i la vacunació, que han afectat de manera potent la descripció de l'epidemiologia de la malaltia (49).

La vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent (PPSV23) es va introduir l'any 1983. La vacuna és una barreja de 23 polisacàrids capsulars de 23 serotips diferents: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F i 33F. Els serotips inclosos en aquesta vacuna eren els causants del 85 % de les infeccions pneumocòcciques descrites en el moment del seu llançament (50). Els antígens polisacàrids indueixen una resposta humoral, raó per la qual activen cèl·lules  $\beta$  madures, i aquest fet provoca que la resposta immune es perdi al llarg dels anys, i també s'ha comprovat que com que no genera protecció de mucoses, no modifica l'estat de portador (51). La resposta humoral depèn de l'edat, per la qual cosa en els menors de 2 anys la vacuna no és capaç d'induir immunitat; així mateix, s'ha descrit una eficàcia disminuïda en pacients d'edat avançada, amb comorbiditats i amb infecció pel virus d'immunodeficiència humana (VIH) (52-54).

Davant la baixa resposta immunitària que produeix la PPSV23, es van desenvolupar vacunes antipneumocòcciques conjugades que incorporen adjuvants i que confereixen una resposta combinada humoral i cel·lular mitjançada per cèl·lules T, de manera que generen memòria immunològica; per aquest motiu, són més immunogèniques per a immunodeprimits i per a nens petits (51).

L'any 2000 es va aprovar la PVC7, una vacuna que incloïa els 7 serotips causants de les principals MPI en nens als EUA (55): 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F i 23F, que està conjugada amb una variant no tòxica de la toxina de la diftèria proteïna CRM (Prevenar, Pfizer). S'ha descrit que la vacuna origina també resposta immunològica a nivell de les mucoses, fet que incrementa la producció d'IgA local, que és capaç de modificar l'estat de portador (56). Aquest fet té una importància epidemiològica transcendental, ja que els nens constitueixen el principal reservori de *S. pneumoniae*.



La PCV7 va ser desplaçada per la vacuna antipneumocòccica 10-valent (PCV10) l'any 2009. En aquesta nova vacuna, als serotips de la PCV7 s'hi van afegir els serotips 1,5 i 7F, donada la seva elevada prevalença i la seva capacitat de produir brots i MPI en nens. Aquesta vacuna està constituïda per polisacàrids dels serotips del pneumococ units covalentment amb la proteïna D d'*Haemophilus influenzae* no tipable.

Finalment, al febrer del 2010 la Food and Drug Administration (FDA) va autoritzar la comercialització de la vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent (PCV13), que ha desplaçat les dues anteriors. Inclou els serotips de la PCV10 més els serotips 3, 6A i 19A unida a la mateixa proteïna que la PCV7 (Prevenar13; Pfizer).

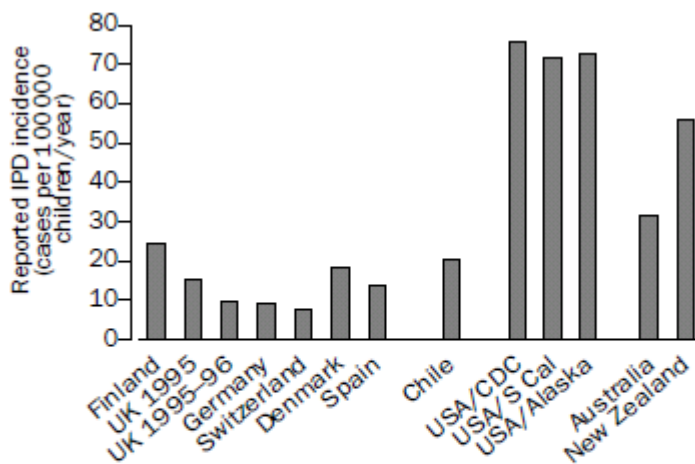
L'Advisory Committee on Immunization Practice (ACIP) recomana la vacunació amb la PCV13 a tots els infants de 2 a 59 mesos d'edat, als nens de 60 a 71 mesos d'edat i als adults que tinguin un risc de desenvolupar MPI, així com a tots els pacients majors de 50 anys amb malaltia de Hodgkin, leucèmia, limfoma, mieloma múltiple, insuficiència renal, síndrome nefròtica, trasplantament d'òrgan sòlid o de cèl·lules hematopoètiques, tractament quimioteràpic o immunosupressor o infecció per VIH.

Les indicacions de la vacuna antipneumocòccica a Catalunya són, segons el Departament de Salut:

- Vacunació amb PPSV23 en adults amb alt risc de morbimortalitat per pneumococ, és a dir, els majors de 60 anys o amb alguna de les malalties següents: pacients amb malalties cròniques (cardiovascular, pulmonar, DM, fístula LCR, implant coclear, alcoholisme, hepatopatia crònica o cirrosi hepàtica, tabaquisme), adults immunodeprimits (immunodeficiències congènites o adquirides, infecció per VIH, insuficiència renal o síndrome nefròtica, leucèmia; limfoma, mieloma múltiple, persones a les quals s'ha fet un trasplantament o amb tractaments immunosupressors) i pacients amb asplènia anatòmica o funcional (anèmia per cèl·lules falciformes, asplènia congènita o adquirida, disfunció esplènica).
- Vacunació amb PCV13 en adults amb més risc de malaltia invasiva greu (portadors de fístula LCR, persones amb implant coclear, persones amb antecedent d'MPI confirmada, cirrosi hepàtica), pacients immunocompromesos (immunodeficiències congènites o adquirides, infecció per VIH, insuficiència renal crònica severa i

síndrome nefròtica, leucèmia; limfoma, mieloma múltiple, altres neoplàsies, persones a les quals s'ha fet un transplantament i amb tractaments immunosupressors) i pacients amb asplènia anatòmica o funcional (anèmia per cèl·lules falciformes, asplènia congènita o adquirida, disfunció esplènica). En els menors de 5 anys, la vacuna antipneumocòccica PCV13 s'administra en el calendari vacunal als 2, 4 i 11 mesos (57).

Ja amb anterioritat a la introducció de les vacunes conjugades, hi ha diferències considerables en la incidència d'MPI entre països (vegeu la figura 1). A més, sabem que existeixen importants variacions en les taxes de vacunació infantil pel que fa a la vacuna antipneumocòccica conjugada: així, tenim taxes elevades, de fins al 90 % als EUA, i d'altres força inferiors, com la del 50 % a Espanya (58, 59). Aquests dos fets provoquen una major dificultat i variabilitat en l'anàlisi dels resultats.



**Figura 1. Incidència de l'MPI en nens menors de 5 anys (37)**

Dades de Finlàndia, 1985-89; Regne Unit, 1995; Regne Unit, 1995-96; Alemanya, 1997-98; Suïssa, 1985-95; Dinamarca, 1989-94; Espanya, 1996-97; Xile, 1998-99, EUA (Centers for Disease Control and Prevention), 1998; EUA (southern California), 1992-95; EUA (Alaska), 1986-90; Austràlia, 1991-96, i Nova Zelanda, 1984-92.

IPD=Invasive Pneumococcal Disease

En moltes àrees geogràfiques, després de la implementació de la vacunació en nens s'ha descrit una disminució significativa de la malaltia pneumocòccica invasiva tant en infants com en adults, derivada del fenomen d'immunització de grup (42). Amb tot,

s'ha descrit, arran d'un fenomen de reemplaçament, un augment de la colonització nasofaríngia dels serotips no vacunals en els nens (60).

Des del 2016, la vacuna la està inclosa en el calendari vacunal infantil, raó per la qual el canvi de paradigma en l'MPI en la nostra àrea encara podrà ser més pronunciat (vegeu la figura 2).

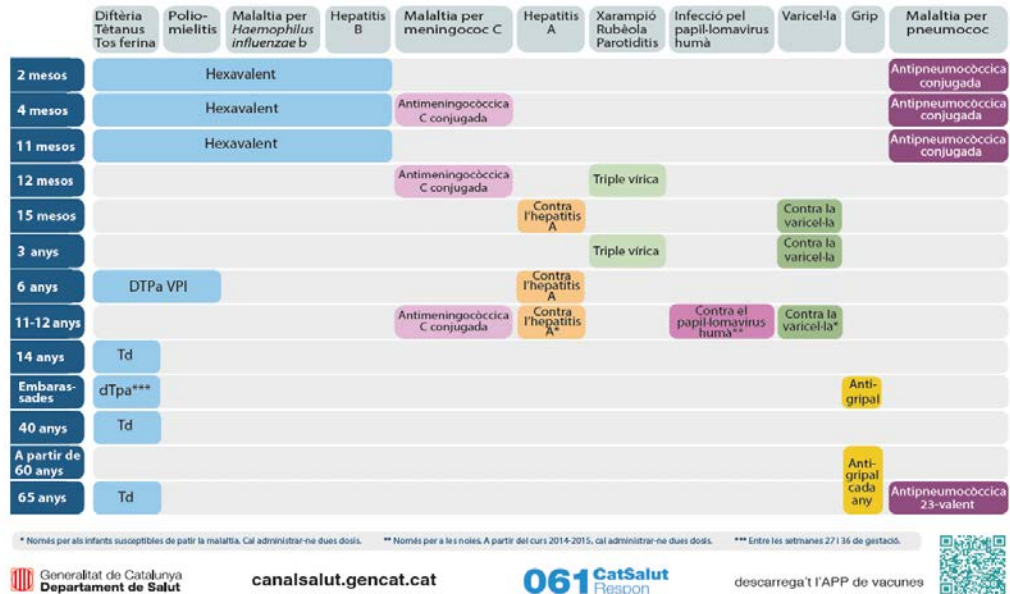


Figura 2. Calendari de vacunacions sistemàtiques a Catalunya

### 3. Biomarcadors genètics de l'hoste en la pneumònia pneumococccica

La malaltia pneumococccica invasiva és una entitat ben estudiada que es dona en els extrems de la vida i en pacients amb algun factor de risc conegut (vegeu la figura 3).

Els factors de risc definits coneguts relacionats amb l'MPI són immunodeficiències primàries o adquirides, com la infecció pel VIH, l'asplènia o l'esplenectomia, el dèficit de complement o l'hipogammaglobulinèmia, així com l'hàbit tabàquic, l'MPOC o l'asma, la cirrosi hepàtica, la malaltia autoimmunitària, el tumor sòlid o hematològic actiu, el tractament immunosupressor o les teràpies biològiques, l'ús crònic de corticosteroides (més de 20 mg prednisona/dia durant més de 15 dies) o la neutropènia (61).

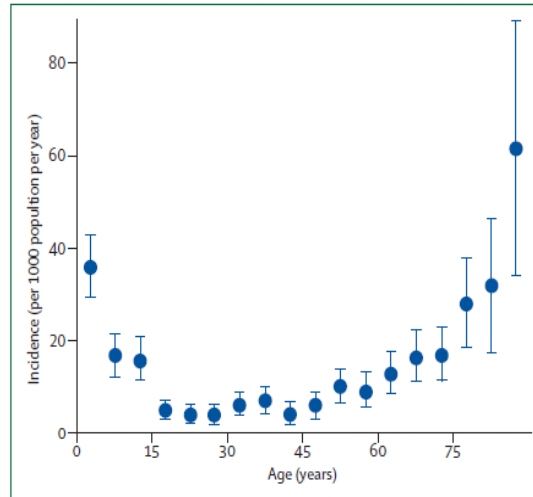


Figura 3. Incidència de la PAC relacionada amb l'edat (2)

Malgrat això, és conegut també el fet que existeix una predisposició hereditària a la mort per causa infecciosa. Hi ha factors genètics de l'hoste que són determinants a l'hora d'entendre la mortalitat, els quals, al seu torn, estan associats als que s'han descrit clàssicament, com la virulència del patògen o l'activitat dels antimicrobians (62-64).

Quant a l'MPI, al 1954 Austian i Gold (65) van observar que en pacients amb bacterièmia pneumocòccica la mortalitat al llarg dels cinc primers dies de la malaltia és similar independentment que el grup de pacients hagi estat tractat amb penicil·lina, seroteràpia o que no hagin rebut cap tipus de tractament. Els autors van concloure que el tractament antibiòtic podia oferir poc a aquells pacients destinats a morir a l'inici de la malaltia, cosa que implicava una certa predisposició genètica que explicaria la mortalitat deguda a l'MPI.

Definim *mutació genètica* com un canvi o alteració en la seqüència del DNA, i definim *polimorfisme* com una mutació genètica amb una freqüència per sobre de l'1 % en la població general. El *Syngle Nucleotide Polymorphism* ('polimorfisme d'un sol nucleòtid', SNP) és la forma més simple de polimorfisme (consisteix en el canvi d'un sol nucleòtid) i representa el 90 % dels polimorfismes humans. Té lloc entre 0.5 i 10 cada 1000 parells de bases. Existeixen més de 10 milions d'SNP identificats, tots descrits en

l'International HapMap Project (66). En tenim de silents i de no silents, i existeixen tres tipus de mutacions o polimorfismes: la deleció, l'addició i el canvi.

En la darrera dècada s'han descrit SNP de diferents gens que codifiquen molècules clau en els camins de la resposta immune innata i adaptativa de l'MPI (complement, citocines i altres mediadors inflamatoris). Així i tot, la informació és escassa i aquestes associacions encara no s'han validat en la població espanyola (67, 68).

Per saber quins són els biomarcadors genètics associats al risc d'MPI, és primordial conèixer aquesta resposta immune. Sabem que *S. pneumoniae*, en entrar dins l'organisme com a patògen, desencadena una complexa cascada inflamatòria. La resposta inflamatòria innata representa el primer pas de la defensa no específica de l'hoste i és la resposta més precoç adreçada a contenir la infecció en els primers minuts o hores (67). Un requisit per a l'inici de la resposta de l'hoste és el reconeixement del patògen per part del sistema immune.

El primer reconeixement dels patògens invasors són els *Pattern Recognition Receptors* (PRR), que estan localitzats a la superfície de les cèl·lules de la barrera epitelial, així com de les cèl·lules hematopoètiques. S'han identificat diferents classes de PRR en el transcurs dels darrers quinze anys: *Toll-like receptors* (TLR), *NOD-like receptors* (NLR), *RIG-I-like receptors* (RLR) i *manifold cytosolic DNA sensors* (69). S'han descrit components cel·lulars de *S. pneumoniae* (àcid lipoteicoic o peptidoglicà), que són reconeguts pel TLR-2 i TLR-9 (70).

Després de l'activació, la majoria de PRR, mitjançant l'estimulació de la transcripció d'NF- $\kappa$ B i IRF3/7, regulen la producció de mediadors inflamatoris com ara TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IFN $\alpha/\beta$ , KC i MCP-1. Membres de la IL1, així com el factor de necrosi tumoral TNF i la IL17, també contribueixen a l'estimulació de l'NF- $\kappa$ B, que és el principal regulador de la resposta immune innata (vegeu la figura 4).

El TNF $\alpha$  és descrit com la citocina crítica precoç a l'inici de la cascada inflamatòria de la pneumònia pneumocòccica en combinació amb la IL1 (71).

Els PRR regulen les citocines que estimularan les cèl·lules immunes, activaran la fase aguda del reclutament de neutròfils i l'exsudat de macròfags i que controlaran la resposta immune adaptativa. L'acció dels neutròfils és absolutament necessària per al control de l'*S. pneumoniae* i resulta determinant de cara a la resolució de la pneumònia (72).

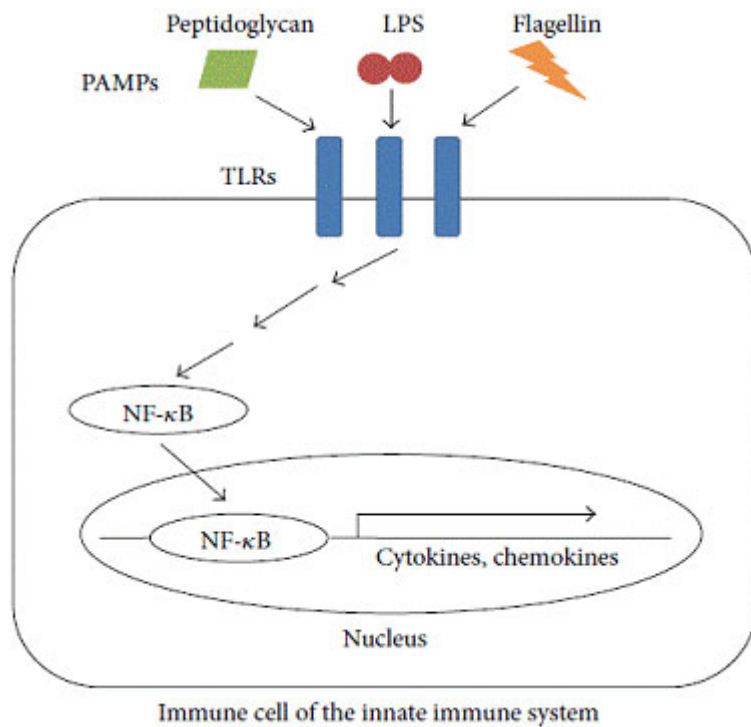


Figura 4. Inici de la resposta immune després d'una infecció en el sistema immunitari innat (117)

Posteriorment, la regulació de la resposta inflamatòria per citocines antiinflamatòries com la IL10 o la IL4 garantiran una resposta equilibrada (vegeu taula 2).

Tradicionalment, la sèpsia era vista com una resposta excessiva inflamatòria deguda a un patogen invasiu, però avui dia s'ha proposat la resposta immune com un procés dinàmic en què té lloc un procés precoç d'hiperinflamació seguit i enllaçat amb un estat perllongat d'immunosupressió crucial en la patogènesi i un dany tissular, així com amb la fallida multiorgànica i la mort per sèpsia (73).

D'entre tots els actors participants en la resposta inflammatòria, algunes variants genètiques de determinades citocines (IL1B, IL1R1, IL4, IL10, IL12B) s'han demostrat associades amb risc d'MPI en un estudi poblacional (74).

Taula 2 (117). Resum de les principals funcions de les citocines pro i antiinflamatòries

<b>Citocines proinflamatòries</b>	<b>Actua</b>	<b>Acció</b>
TNF $\alpha$	Cèl·lules immunes del sistema adaptatiu (macròfags, limfòcits)	Diferenciació i activació de les cèl·lules immunes induint febre, apoptosi, etc.
IL1	Cèl·lules immunes del sistema adaptatiu (macròfags, limfòcits)	Induir febre, hematopoesi, extravasació de les cèl·lules inflammatòries.
IL6	Cèl·lules immunes del sistema adaptatiu (macròfags, limfòcits)	Activació dels limfòcits $\beta$ i T, modulació de l'hematopoesi en la fase aguda, inducció de febre.
IL17	Cèl·lules dendrítiques	Promou resposta Th2.
IFN $\gamma$	Cèl·lules NK, Th1 i CD8, cèl·lules T citotòxiques	Activitat antiviral, immunoparàlisi en sèpsia.
IL12	Monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques	Promou la resposta adaptativa tipus I i la diferenciació del limfòcit Th1 T, així com la resposta antitumoral immune.
<b>Citocines antiinflamatòries</b>		
IL10	Cèl·lules immunes del sistema adaptatiu (macròfags, limfòcits)	Propietats immunosuppressives, com evitar la presentació antigènica o la fagocitosi.
IL4	Basòfils, eosinòfils, limfòcits T Th2, mastòcits	Diferenciació dels limfòcits Th2.

Existeixen estudis que han revelat associacions de variants genètiques de la família de les proteïnes dels inhibidors NFKb (I $\kappa$ B) i l'augment de risc d'MPI (63, 75) (vegeu la taula 3).

Taula 3. Estudis genètics d'associació entre casos i controls en l'MPI

	Gens candidats	Estudis
<b>Immunitat innata</b>		
	TLR2	Moens <i>et al.</i> 2007, Yuan <i>et al.</i> 2008, Smelaya <i>et al.</i> 2016 (70, 76, 77)
	TLR4	Moens <i>et al.</i> 2007, Smelaya <i>et al.</i> 2016 (76, 77)
	TIRAP	Khor <i>et al.</i> 2007 (78)
	TLR9	Smelaya <i>et al.</i> 2016 (77)
	NFKBIA	Chapman <i>et al.</i> 2007 (75)
	NFKBIB	Chapman <i>et al.</i> 2007 (75)
	TLR9	Smelaya <i>et al.</i> 2016 (77)
	SFTP A1	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
	SFTP B	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
	CD46	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
<b>Immunitat adquirida</b>		
	FCGR2A	Yee <i>et al.</i> 2000, Yuan <i>et al.</i> 2003, Moens <i>et al.</i> 2006, Yuan <i>et al.</i> 2008 (70, 80-83)
<b>Complement</b>		
	MBL2	Roy <i>et al.</i> 2002, Kronborg <i>et al.</i> 2002, Moens <i>et al.</i> 2006 (64, 82, 84)
	MBL	Moens <i>et al.</i> 2006 (82)
<b>Citocines</b>		
	TNF	Schaaf <i>et al.</i> 2003 (74)
	LTA	Schaaf <i>et al.</i> 2003 (74)
	IL10	Smelaya <i>et al.</i> 2016 (77)
	IL6	Smelaya <i>et al.</i> 2016 (77)
	IL1B	Smelaya <i>et al.</i> 2016 (77)
	IL8	Smelaya <i>et al.</i> 2016 (77)
	IL1R1	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
	IL4	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
	IL12B	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
<b>Altres</b>		
	CRP	Roy <i>et al.</i> 2002 (85)
	PTPN22	Chapman <i>et al.</i> 2006 (86)
	FCN2	Chapman <i>et al.</i> 2007 (87)
	FAS	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)
	PTFAR	Lingappa <i>et al.</i> 2011 (79)





## JUSTIFICACIÓ

La pneumònia aguda de la comunitat és una malaltia molt comuna en el nostre medi. És la principal causa de mortalitat de causa infecciosa en nens en països en vies de desenvolupament i en gent gran en països desenvolupats. Tanmateix, encara no es coneix l'etiologia de la majoria de les pneumònies.

Una millor identificació dels patògens que causen aquesta malaltia, així com els canvis epidemiològics produïts a conseqüència de les polítiques de salut i els potencials factors genètics de l'hoste que l'hi predisposen, poden condicionar una millora en el tractament i el pronòstic de la malaltia.



## HIPÒTESIS

- La utilització de mètodes moleculars afegits als cultius convencionals pot augmentar la capacitat de diagnòstic etiològic de la pneumònia aguda de la comunitat, amb un especial èmfasi en la detecció de virus patògens.
- La introducció en el programa de vacunació infantil de les vacunes conjugades pot produir canvis epidemiològics en la malaltia per *S. pneumoniae* en la població adulta de la nostra àrea.
- L'estudi del substrat genètic pot identificar elements de la immunitat innata que condicionen una major susceptibilitat a la malaltia pneumocòccica invasora.



## OBJECTIUS

### **ESTUDI 1: «Aetiology of community-acquired pneumonia among adults in an H1N1 pandemic year: the role of respiratori viruses»**

- Objectiu 1: Avaluar la capacitat de millora en el diagnòstic etiològic de la PAC per mitjà de l'ús sistemàtic d'una prova de PCR que permet identificar els principals virus patògens implicats en la PAC.
- Objectiu 2: Descriure l'etiologia i la forma de presentació clínica de la PAC en pacients admesos en un hospital d'aguts, comparant les característiques de la pneumònia bacteriana i les de la pneumònia viral.

### **ESTUDI 2: «Impact of vaccination on invasive pneumococcal disease in adults with focus on the immunosuppressed»**

- Objectiu 3: Estudiar l'evolució de la incidència global i per serotips de l'MPI en adults (en especial en els immunodeprimits) abans i després de la introducció de la vacuna conjugada en la població infantil a la nostra àrea.

### **ESTUDI 3: «Genetic susceptibility to invasive pneumococcal disease»**

- Objectiu 4: Identificar possibles associacions entre polimorfismes genètics en gens involucrats en la resposta immune innata i la susceptibilitat a la malaltia pneumocòccica invasora en la població adulta.



## ARTICLES





Per preservar els drets d'autors als editor s'ha extret l'article:

Sangil A, Calbo E, Robles A, Benet S, Viladot ME, Pascual V, et al. Aetiology of community-acquired pneumonia among adults in an H1N1 pandemic year: the role of respiratory viruses. EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES 2012(10):2765-2772

**DOI** 10.1007/s10096-012-1626-6

Podeu consultar un resum dels permisos que normalment es donen com a part de l'acord de transferència de drets d'autors als editors a [SHERPA/RoMEO](#)

Per preservar els drets d'autors als editor s'ha extret l'article:

Sangil A, Xercavins M, Rodríguez-Carballeira M, Andrés M, Riera M, Espejo E, et al. Impact of vaccination on invasive pneumococcal disease in adults with focus on the immunosuppressed. J Infect 2015 -;71(4):422.

**DOI** 10.1016/j.jinf.2015.07.004

Podeu consultar un resum dels permisos que normalment es donen com a part de l'acord de transferència de drets d'autors als editors a [SHERPA/RoMEO](#)

# Genetic susceptibility to invasive pneumococcal disease

Anna Sangil Betriu<sup>1,2</sup>, María J Arranz<sup>3</sup>, Roberto Güerri-Fernández<sup>4</sup>, Maite Perez<sup>5</sup>, Helena Monzon<sup>6</sup>, Antoni Payeras<sup>7</sup>, Marta Andres<sup>8</sup>, Jorge Torviso<sup>8</sup>, Laura Ibañez<sup>3</sup>, Javier Garau<sup>9</sup>, Esther Calbo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitari Mutua Terrassa, Terrassa, Spain.

<sup>2</sup>Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Fundació Docència i Recerca Mútua Terrassa, Terrassa, Spain.

<sup>4</sup>Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup>Xerencia de Gestión Integrada de Vigo, Vigo, Spain.

<sup>6</sup>Hospital San Joan de Deu de Martorell, Martorell, Spain.

<sup>7</sup>Hospital Universitari Son Llatzer, Palma de Mallorca, Spain.

<sup>8</sup>Consorti Sanitari de Terrassa, Terrassa, Spain.

<sup>9</sup>Clínica Rotger QuirónSalud, Palma de Mallorca, Spain

## Corresponding author

Esther Calbo, MD, PhD

Infectious Disease Unit. Service of Internal Medicine

Hospital Universitari Mútua Terrassa

Plaza Dr Robert 5

08221 Terrassa, Barcelona, Spain

TEL: 34.93.7365050 (ext 3931 or ext 182521)

[esthercalbo@hotmail.com](mailto:esthercalbo@hotmail.com); [ecalbo@mutuaterrassa.es](mailto:ecalbo@mutuaterrassa.es)

**Keywords:** Invasive Pneumococcal Disease; genetic susceptibility; innate immune response; *S. pneumoniae*, pneumonia

**RUNNING TITLE:** IPD and genetic susceptibility

**Abstract words:** 201

**Text words:** 2499

## **Abbreviation list**

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Inhibitors of the NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B)

Interleukin-1 receptor type 1 (IL-1R)

Invasive pneumococcal disease (IPD)

Nuclear factor-kappaB (NF $\kappa$ B)

Single nucleotide polymorphisms (SNP)

Without risk factors (WRF)

## Abstract

**Background:** The pathogenesis of IPD remains unknown, especially among middle-aged individuals without risk factors (WRF).

**Objectives:** The aim of the present study was to investigate the role of single nucleotide polymorphisms (SNP) within key genes involved in innate immune response on IPD susceptibility.

**Methods:** Forty-three SNPs within 10 immunological genes were investigated in a cohort of 144 Caucasian IPD patients and 280 ethnically matched controls.

**Results:** The allele distribution of the NFKBIA rs1050851 and NFKBIE rs2282151 variants were associated with IPD susceptibility ( $\chi^2=4.23$ ,  $p=0.04$  and  $\chi^2=5.13$ ,  $p=0.02$ , respectively). Additionally, the genotype distribution of NFKBIZ rs645781 ( $\chi^2=8.25$ ,  $p=0.02$ ) and IL1R1 rs3917254 ( $\chi^2=6.70$ ,  $p=0.04$ ) were also associated with IPD risk. When only IPD-WRF patients were considered; the allele distribution of IL1R1 rs2160227 ( $\chi^2= 5.62$ ,  $p=0.03$ ), rs13020778 ( $\chi^2=5.73$ ,  $p=0.02$ ), rs3917267 ( $\chi^2= 3.72$ ,  $p=0.05$ ) and IL4 rs2227284 ( $\chi^2=3.76$ ,  $p=0.05$ ) and the genotype distribution of IL10 rs3024509 ( $\chi^2= 7.70$ ,  $p=0.02$ ), IL1R1 rs3917254 ( $\chi^2= 13.40$ ,  $p=0.001$ ), NFKBIZ rs645781 ( $\chi^2= 13.86$ ,  $p=0.001$ ) and rs677011 ( $\chi^2= 9.06$ ,  $p=0.01$ ) variants were associated with IPD risk.

**Conclusions:** We found several associations between variants in the IL1R1, IL4, IL10, NFKBIE, NFKBIA, and NFKBIZ genes and risk of IPD. If validated, these biomarkers may help to identify people with higher risk of IPD.

## Introduction

*Streptococcus pneumoniae* is the leading cause of a broad spectrum of diseases including pneumonia, meningitis, bacteremia, and otitis media [1]. Invasive pneumococcal disease (IPD) has a high mortality rate. It accounts for over a million deaths worldwide annually and mortality is highest in children younger than 5 years of age in developing countries [2]. The incidence of IPD declined from 24.4 to 13.5/100,000 in the US, after pneumococcal conjugate vaccine introduction [3]. We have recently reported similar values in Spain [4].

IPD risk has been associated with pathogen virulence, host susceptibility and epidemiologic factors. Several primary and acquired immunodeficiencies have been associated with IPD susceptibility [5]. However, the pathogenesis of IPD remains unknown in most patients, especially among middle-aged individuals without known risk factors. Sporadic IPD may be caused by unknown underlying host factors that might confer a selective predisposition to IPD.

Single nucleotide polymorphisms (SNP) of several genes encoding for key molecules in pathways of the innate and adaptive host immunity, complement, cytokines and other inflammatory mediator pathways have been associated with susceptibility to IPD [6-8]. Other genes including IL10 and TNF alpha have been identified as regulators of the intensity of the inflammatory response and thus associated with the severity and outcome of pneumococcal diseases [9-11]. Genetic variants in five different cytokines (IL1b, IL1R1, IL4, IL10, IL12B) were found associated with IPD risk in a population based study of European-American and African-American children [6]. There is increasing evidence supporting the critical role of the nuclear factor-kappaB (NFkb) pathway in the host immune response to pneumococcal infection [9]. NFkb is a major regulator of innate immunity. Its activation results in the expression of genes encoding both pro and anti-inflammatory cytokines [12]. Previous studies have reported associations between genetic variants of the inhibitors of the NFkb (Ikb) protein family and increased risk of IPD [7, 8]. However, these findings need confirmation in independent studies. We hypothesized that genetic factors in these crucial pathways may contribute to IPD risk and may explain, at least in part, the presence of IPD in middle aged adult patients that do not present known risk factors.

The aim of the present study was to investigate the impact of genetic polymorphisms in ten candidate genes (IL10, IL12B, IL1A, IL1B, ILR1, IL4, NFKBIA, NFKBIE, NFKBIL2 & NFKBIZ) involved in

the innate immunologic response on the susceptibility to IPD in a population of middle-aged Caucasian patients and to assess their value as IPD susceptibility biomarkers.

## **Material and methods**

### **Study sample**

#### *Inclusion criteria and clinical variables*

Participants were identified through the Microbiology Department database of six acute care centers in Spain. The search was restricted to individuals who suffered an episode of IPD between 1990 and 2013 and were aged 18 to 50 years during the IPD episode. Participants were contacted by phone and blood samples for DNA extraction were obtained at the time of recruitment. Data including the clinical syndrome, severity of disease, outcome, and site of *Streptococcus pneumoniae* isolation were retrospectively collected from the medical notes. Additionally, demographics, comorbidities and presence of IPD risk factors were prospectively recorded via personal interviews. Finally, one hundred and forty-four individuals were recruited for the study (mean age; 38 years  $\pm$  7.2, 57% males). The most frequent IPD clinical syndrome was pneumonia as anticipated. Population characteristics and risk factors distribution are summarized in table 1 and table 2. Risk factors included smoking, COPD or asthma, liver cirrhosis, splenectomy or asplenia, autoimmune disease, hypogammaglobulinemia or hypocomplementemia, active solid or hematologic tumors, immunosuppressive or biological therapies, chronic systemic steroid use (>20 mg prednisone/day > 15 days), neutropenia, and HIV infection. One third of the recruited patient did not present known risk factors. In addition, 280 ethnically matched healthy adult blood donors were collected from Hospital Universitari Mutua Terrassa. This sample has a statistical power of 95% to detect associations (odds ratios  $\geq$  2.5) with genetic variants with a minor allele frequency  $\geq$  0.05. Only Caucasian subjects were analysed in order to reduce genetic heterogeneity. All participants gave informed consent and the study was approved by the respective Ethics Committees.

### **Genetic characterisation of the sample**

DNA was extracted from whole blood using a commercial kit and following the manufacturer recommendations (EZNA SQ blood DNA Kit II, VWR-Omega). DNA samples were stored at -20°C until required for study. Forty-three informative single nucleotide polymorphisms (SNPs) within



the 10 candidate genes (IL10, IL12B, IL1A, IL1B, ILR1, IL4, NFKBIA, NFKBIE, NFKBIL2 & NFKBIZ) were selected for study using the tagSNP option in the hapmap programme ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org), selection criteria:  $r^2=0.8$  and minor allele frequency= 0.05, see table I for complete list). Four of the selected SNPs (IL1A rs3783526, IL1Brs1143643, ILR1 rs2160227 & rs2287047) had been associated with IPD risk in a previous study [6]. Genotyping was performed using the Sequenom MassARRAY platform and iPLEX Gold reaction assays (CEGEN, Santiago de Compostela, Spain). Five percent of the samples were retested for confirmation. A genotyping success rate higher than 95% was obtained for all SNPs and samples.

## Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the G\*Power Calculator, SPSS (version 21, IBM, USA), PLINK (version 1.07, Purcell et al. 2007) and EpilInfo (Centers for disease control and prevention, version 7.1.4.0) statistical packages. Single marker analyses were performed using chi-square tests to compare the allele and genotype distributions between patients and control subjects. A second analysis was performed including only the subgroup of patients who did not present known IPD risk factors (IPD-WRF). Phased haplotype analyses (using the E-M algorithm) including all SNPs within a gene were performed.

## Results

Tables 3 and 4 summarize the results of the genetic comparisons between IPD patients and controls, and between IPD patients without known risk factors (IPD-WRF) and controls, respectively. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium, except IL1A rs2856838 ( $p=0.04$ ).

Single marker analyses revealed significant differences in the allele distribution of the NFKBIA rs1050851 ( $\chi^2=4.23$ ,  $p=0.04$ ) and NFKBIE rs2282151 ( $\chi^2=5.13$ ,  $p=0.02$ ) polymorphisms (see table 3). The rs1050851-T and rs2282151-C alleles were relatively more frequent in IPD patients than in controls (0.25 vs 0.18 and 0.26 vs 0.19, respectively). When comparing genotype frequencies, a significant association between the genotype distribution of the NFKBIZ rs645781 and risk of IPD was observed ( $\chi^2=8.25$ ,  $p=0.02$ ). The frequency of individuals with the genotype rs645781-C/C was higher amongst IPD patients (10%) than in controls (4%). Additionally, an association was observed between the genotype distribution of IL1R1 rs3917254 and IPD risk ( $\chi^2=6.70$ ,  $p=0.04$ ), with a higher frequency of rs3917254-C/C in IPD patients (4%) than in controls (0.4%). Haplotype

analyses showed association between allelic combinations of polymorphisms in the genes IL1R1 ( $\chi^2=3.83$ ,  $p=0.05$ ) and NFKBIE ( $\chi^2=4.71$ ,  $p=0.03$ ) and IPD risk (see table 5). The analysis of the subgroup of patients without risk factors (IPD-WRF) revealed the presence of several associations. The allelic distribution of the polymorphisms IL1R1 rs2160227 ( $\chi^2= 5.62$ ,  $p=0.03$ ), rs13020778 ( $\chi^2=5.73$ ,  $p=0.02$ ), rs3917267 ( $\chi^2= 3.72$ ,  $p=0.05$ ) and IL4 rs2227284 ( $\chi^2=3.76$ ,  $p=0.05$ ) were associated with IPD, with rs2160227-C (0.81 in IPD-WRF patients vs 0.68 in controls), rs13020778-T (0.67 vs 0.54), rs3917267-A (0.47 vs 0.36) and rs2227284-A (0.35 vs 0.25) as risk alleles (see table IV). The genotype distribution of IL10 rs3024509 ( $\chi^2= 7.70$ ,  $p=0.02$ ), IL1R1 rs3917254 ( $\chi^2= 13.40$ ,  $p=0.001$ ), NFKBIZ rs645781 ( $\chi^2= 13.86$ ,  $p=0.001$ ) and rs677011 ( $\chi^2= 9.06$ ,  $p=0.01$ ) were also significantly associated with IPD risk, with rs3024509-C/C (2% in IPD vs 0 in controls), rs3917254-A/A (4% vs 0.4%), rs645781-C/C (16% vs 4%) and rs677011-G/G (23% vs 11%) as the risk genotypes. The risk genotypes were also relatively more frequent in IPD-WRF patients than in IPD patients presenting known risk factors (see figure 1). Haplotype analyses revealed no clear associations (data not shown). Only an IL1R1 haplotype (AGCTGCGGGAG) showed a trend towards association with IPD-WRF ( $\chi^2= 3.70$ ,  $p=0.054$ ).

## Discussion

We investigated the influence of 43 SNPs within 10 immunological genes (IL10, IL12B, IL1A, IL1B, IL1R1, IL4, NFKBIA, NFKBIE, NFKBIL2 & NFKBIZ) on IPD risk in a cohort of 144 Caucasian IPD patients and 280 controls. We found several associations between variants in the IL1R1, IL4, IL10, NFKBIE, NFKBIA, and NFKBIZ genes and risk of IPD.

Several IL1R1 polymorphisms were found associated with IPD risk when comparing the genotype distribution of IPD patients vs. controls (rs3917254) and when comparing the genotype and allele distributions between IPD patients without known risk factors and controls (rs2160227, rs13020778, rs3917254 & 3917267). These polymorphisms are intronic variants of unknown function, although they are located in areas that may affect transcription regulation. Interestingly, a previous study had found association between an IL1R1 rs2160227 variant and IPD risk in European Americans [6], although we could not replicate their findings of association between the rs2287047 polymorphism and IPD risk. Differences in sample size and population group may account for this discrepancy.

IL1R1 is an important mediator of the activity of IL1 alpha and IL1 beta. Prolonged bacterial colonization was detected in interleukin-1 receptor type 1 (IL-1R) deficient mice [13]. IL-1R type I deficient mice were also found more susceptible to pneumococcal meningitis and had higher mortality compared with wild-type mice [14]. Our results suggest that genetic variants in the IL1R1 gene may alter the expression of this key receptor and therefore influence susceptibility to IPD.

A second Interleukin gene, the IL4 was associated to IPD risk. The genotype distribution of the only SNP analysed within this gene (rs2227284) was found to be associated with IPD risk when evaluating patients without risk factors. No associations with this intronic variant of unknown function were detected when analysing the entire cohort, therefore, this association may identify patients at high risk of IPD. An IL4 rs243302 variant has been previously associated to IPD risk in a European-American cohort [6]. IL-4 is a major factor in B cell activation and differentiation [15]. High levels of IL-4 mRNA were associated with higher survival rates in a murine model of pneumococcal pneumonia [15]. IL4 and other cytokines were found associated with sepsis severity, organ failure and death in a cohort of patients with septic shock [16]. While all these reports suggest that IL-4 plays an important role in the pathogenesis of sepsis and inflammation, its precise role during the course of the infection remains unknown.

The genotype distribution of IL10 rs3024509 was associated with IPD risk in the studied cohort ( $p=0.02$ ). This association was only evident among patients without known risk factors. The rs3024509 polymorphism is an intronic variant of unknown functionality and its contribution to the disease is unclear. The anti-inflammatory cytokine IL10 plays an important role in the innate immune response. IL10 serum levels correlate with the intensity of the inflammatory response, the severity and the clinical outcome in sepsis, septic shock and CAP [9, 17, 18]. In a previous study, an IL-10 polymorphism was associated with increased IL-10 release and with higher risk for septic shock in IPD patients [9]. IL10 genetic mutations have been previously associated with increased mRNA levels in human blood mononuclear cells stimulated with *S. pneumoniae* and high levels of IL-10 were correlated with a fulminant course of *S. pneumoniae* infection in a murine model of post influenza pneumococcal pneumonia [19, 20]. Our finding constitutes further evidence suggesting that alterations in this gene are important in immunological response to IPD.

The genotype distribution of a NFKBIZ polymorphism (rs645781) was associated with IPD risk in our sample. The statistical significance of this association increased when considering only the IPD-

WRF patients. The rs645781 polymorphism is an intronic variant of yet unknown functionality. A previous study conducted on European and African subjects found association between a NFKBIZ variant (rs600718) and IPD [8]. Additionally, several other NFKBIZ variants were associated with susceptibility to pneumococcal disease. However, this study did not corroborate our finding of association between rs645781 and IPD. Genetic heterogeneity and sample size may explain these discrepancies. Nevertheless, these findings suggest that genetic variants in the NFKBIZ gene may play an important role in IPD.

The allelic distribution of two variants in the NFKBIA (rs1050851) and the NFKBIE (rs2282151) genes were associated with IPD susceptibility. Previous studies have found a genetic variant in NFKBIE (rs529948, not included in our study) associated with risk of pneumococcal infection in children [21]. Remarkably, genetic variants in NFKBIA (rs3138053 and rs2233406) have been associated with protection from IPD [7]. The NFKBIA, NFKBIE and NFKBIZ genes encode a protein family of NF- $\kappa$ B inhibitors. NF- $\kappa$ B is essential for cytokine expression, neutrophil recruitment and bacterial killing in pneumococcal pneumonia[22]. The genetic control of this major inflammatory pathway is extremely complex. On one hand, impaired NF- $\kappa$ B activation is associated with immunodeficiency [23], but on the other increased levels of NF- $\kappa$ B activation are associated with a worse outcome from sepsis[22]. More studies are needed on the role of this key pathway to understand the impact of genetic polymorphisms.

In general, the strengths of the findings reported here increased when only considering IPD patients without known risk factors in spite of the reduced sample size. This observation suggests that genetic factors may explain, at least in part, the risk of IPD infection in persons not presenting known risk factors. However, the associations were marginal and of moderate genetic effects (odds ratios between 1.4-1.6 for alleles associated with risk of IPD and around 0.5 for protective alleles) and should be confirmed in independent samples. Nevertheless, these are interesting findings that, if confirmed, could be translated into genetic tests to identify individuals with a higher risk of infection on which preventive interventions such as vaccination could be implemented.

Our study has several limitations. First of all, the sample size is moderate for candidate-gene association studies, although it is a relatively large IPD cohort given the difficulties of collating such a sample. Therefore, the results should be considered as preliminary and should be replicated in

independent studies. Finally, the statistically significant associations found were marginal and did not withstand Bonferroni corrections for multiple analyses (correction factor= 43). However, multiple analyses corrections may be too conservative as SNPs located in the same gene are not independent events. Nevertheless, confirmation in independently collated samples is required.

## **Conclusion**

The innate immune system represents the first non-specific step in host defence. The patterns of host response that drive the *S. pneumoniae* to a limited colonization, with eventual clearance of the pathogen, or to an aggressive path resulting in disease development are still poorly understood. In the present study, we have found evidence that genetic variants from key cytokines (IL1R1, IL4, IL10) and from I $\kappa$ B genes (NFKBIE, NFKBIA, and NFKBIZ) may predict risk of IPD. Our findings, taken together with previous reports, support the idea that genetics may partially explain susceptibility to pneumococcal infection. If validated, these biomarkers may help to develop future treatments and to identify people with high risk of IPD on which preventive measures such as vaccination could be applied.

## **Acknowledgments**

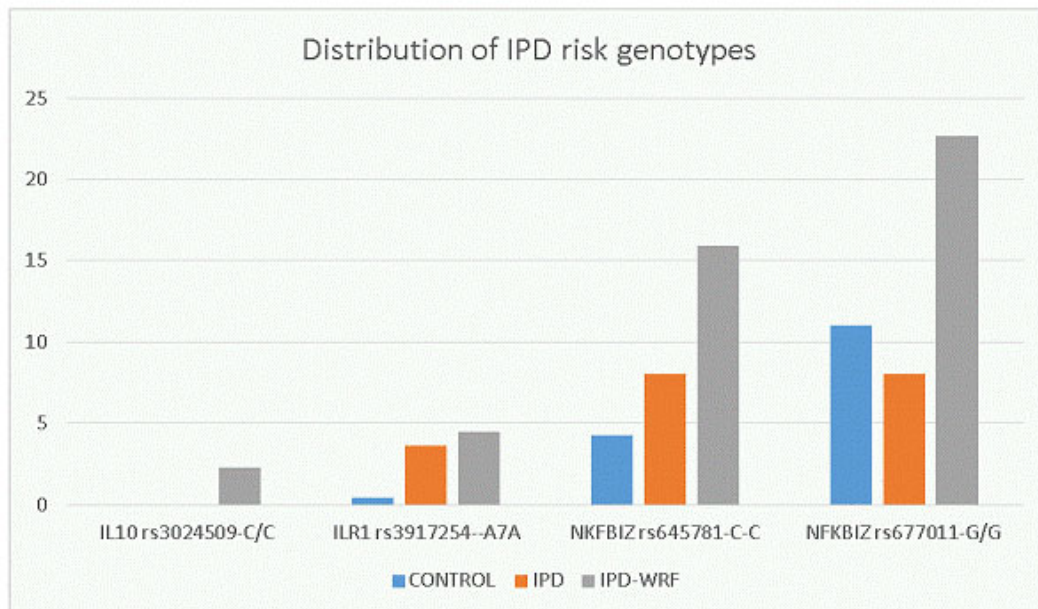
Anna Sangil Betriu is the guarantor of the content of the manuscript, including the data and analysis.

ASG, ECS had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Participants were recruited by seven of the authors (ASG, HM, RGF, MP, AP, MA and JT). MJA, RGF, MP, HM, AP, MA, JT, LI and JG also contributed substantially to the study design, data analysis and interpretation, and the writing of the manuscript.

## Figures

**Figure 1. Distribution (%) of risk genotypes in controls (N=280), IPD patients presenting known risk factors (IPD, N=100) and IPD without known risk factors (IPF-WRF, N=44)**



**IPD: invasive pneumococcal disease. IPD-WRF: invasive pneumococcal diseases without risk factors.**

## Tables

**Table 1. Characteristics of the study population**

<b>STUDY POPULATION</b>	<b>CASES Whole cohort</b>	<b>CASES With risk factors 100</b>	<b>CASES Without risk factors 44</b>
<b>Mean age, years (SD)</b>	<b>38 (7.2)</b>	<b>38.5 (7.2)</b>	<b>37 (7.3)</b>
<b>Male (%)</b>	<b>82 (56.9%)</b>	<b>61 (61%)</b>	<b>21 (47.7%)</b>
<b>Pneumonia</b>	<b>136 (94.4%)</b>	<b>94 (94%)</b>	<b>42 (95.5%)</b>
<b>Meningitis</b>	<b>7 (4.9%)</b>	<b>5 (5%)</b>	<b>2 (4.5%)</b>
<b>Bacteraemia only</b>	<b>1 (0.7%)</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>0</b>



**Table 2. Description of risk factors in IPD patients (N=100)**

<b>Risk Factors*</b>	<b>Cases (N=100)</b>
Smoking	<b>84</b>
COPD or asthma	<b>26</b>
Hepatic cirrhosis	<b>5</b>
Splenectomy or asplenia	<b>1</b>
Autoimmune disease	<b>4</b>
Hypogammaglobulinemia	<b>1</b>
Active solid tumour or hematologic malignancy	<b>2</b>
Immunosuppressive therapy or Biological therapy	<b>4</b>
Chronic systemic steroid use**	<b>7</b>
HIV infection	<b>16</b>

\*some cases have > 1 risk factor

\*\*>20 mg prednisone/day > 15 days

**Table 3. Summary of genetic comparisons between IPD patients and controls**

GENE	SNP	Ref allele	MAF CTL	MAF IPD	Allele analyses			Genotype analyses		
					$\chi^2$	P	O.R.s	$\chi^2$	P	
IL10	rs3021094	C	0.09	0.08	0.21	0.65	0.88	0.46	0.79	
	rs2222202	T	0.41	0.43	0.12	0.73	1.05	0.30	0.86	
	rs1554286	T	0.21	0.17	1.25	0.26	0.81	1.24	0.54	
	rs3024495	A	0.14	0.15	0.18	0.67	1.09	0.69	0.71	
	rs3024498	G	0.21	0.21	0.02	0.88	1.02	0.38	0.83	
	rs3024509	C	0.07	0.06	0.03	0.86	0.95	2.29	0.32	
	rs1518111	A	0.23	0.22	0.17	0.68	0.93	1.19	0.55	
IL12B	rs730691	T	0.37	0.39	0.46	0.50	1.11	0.64	0.73	
	rs3181216	A	0.28	0.25	0.79	0.37	0.86	0.99	0.61	
	rs1433048	G	0.16	0.16	0.001	0.98	1.01	0.10	0.95	
	rs2853694	C	0.45	0.42	0.53	0.46	0.90	1.45	0.49	
	rs6894567	G	0.21	0.23	0.52	0.47	1.13	1.18	0.55	
	rs2546893	A	0.46	0.48	0.17	0.68	1.06	1.27	0.53	
	rs1368439	G	0.16	0.17	0.15	0.67	1.08	0.15	0.93	
	rs2569253	C	0.46	0.42	0.89	0.35	0.87	1.27	0.53	
	rs2569254	T	0.18	0.18	0.02	0.89	0.97	2.26	0.32	
	rs919766	C	0.14	0.14	0.04	0.85	0.96	0.84	0.66	
	IL1A	rs3783526	A	0.27	0.27	0.001	0.97	1.01	0.13	0.94
		rs1894399	A	0.28	0.26	0.60	0.44	0.88	0.92	0.83
rs2856838		T	0.44	0.46	0.22	0.64	1.07	0.40	0.82	
IL1B	rs1143643	A	0.39	0.39	0.01	0.93	0.99	0.12	0.94	
ILR1	rs2160227	A	0.32	0.30	0.33	0.57	0.91	0.97	0.65	
	rs951193	A	0.03	0.02	0.57	0.45	0.71	0.53	0.30	
	rs13020778	C	0.47	0.44	0.36	0.55	0.92	0.36	0.84	
	rs2287047	T	0.34	0.36	0.20	0.65	1.07	2.08	0.35	
	rs3917243	A	0.41	0.41	0.05	0.82	0.97	0.09	0.95	
	rs3917246	T	0.22	0.22	0.04	0.84	1.04	0.22	0.90	
	rs3917254	A	0.14	0.16	0.81	0.37	1.20	6.70	<b>0.04</b>	
	rs3917267	A	0.36	0.38	0.43	0.51	1.10	1.84	0.40	
	rs3917292	A	0.08	0.09	0.89	0.34	1.28	1.08	0.58	
	rs3917296	G	0.09	0.09	0.06	0.81	1.06	4.92	<b>0.08</b>	
rs3917329	T	0.07	0.06	0.32	0.57	0.84	1.07	0.59		
IL4	rs2227284	A	0.25	0.26	0.20	0.66	1.07	0.97	0.62	
NFKBIA	rs1050851	T	0.19	0.25	4.23	<b>0.04</b>	1.43	4.31	0.12	
	rs696	A	0.43	0.38	1.83	0.18	0.82	4.70	<b>0.09</b>	
NFKBIE	rs730775	G	0.49	0.52	0.85	0.36	1.14	1.26	0.53	
	rs2282151	C	0.19	0.26	5.13	<b>0.02</b>	1.48	5.42	<b>0.07</b>	
NFKBIL2	rs7843998	C	0.49	0.48	0.06	0.81	0.97	0.37	0.83	
NFKBIZ	rs9841857	T	0.27	0.26	0.03	0.86	0.97	5.17	<b>0.08</b>	
	rs7644388	T	0.27	0.31	1.49	0.22	1.22	1.84	0.40	
	rs645781	C	0.25	0.26	0.15	0.70	1.07	8.25	<b>0.02</b>	
	rs677011	G	0.36	0.34	0.38	0.54	0.91	2.94	0.36	
	rs11718446	A	0.26	0.23	1.01	0.32	0.84	2.64	0.27	

Abbreviations: CTL: control, IPD: Invasive Pneumococcal Disease patient, MAF: minimum allele frequency.

**Table 4. Summary of genetic comparisons between IPD patients without risk factors (WRF) and controls**

GENE	SNP	Ref allele	MAF IPD WRF	Allele analyses			Genotype analyses	
				$\chi^2$	P	O.R.s	$\chi^2$	P
IL10	rs3021094	C	0.09	0.003	0.95	0.98	0.78	0.68
	rs2222202	T	0.49	1.72	0.19	1.35	1.62	0.45
	rs1554286	T	0.15	1.68	0.19	0.66	1.60	0.45
	rs3024495	A	0.15	0.01	0.90	1.04	1.41	0.49
	rs3024498	G	0.29	3.20	0.07	1.59	3.33	0.19
	rs3024509	C	0.06	0.11	0.74	0.85	7.70	0.02
	rs1518111	A	0.18	1.14	0.29	0.73	1.46	0.69
IL12B	rs730691	T	0.43	1.32	0.25	1.31	5.85	0.054
	rs3181216	A	0.22	0.95	0.33	0.77	0.95	0.62
	rs1433048	G	0.16	<0.01	0.99	1	0.31	0.86
	rs2853694	C	0.42	0.21	0.65	0.90	0.36	0.84
	rs6894567	G	0.27	1.60	0.20	1.39	3.19	0.20
	rs2546893	A	0.48	0.05	0.82	1.05	1.17	0.56
	rs1368439	G	0.18	0.17	0.68	1.13	0.23	0.89
	rs2569253	C	0.37	2.07	0.15	0.71	2.14	0.34
	rs2569254	T	0.15	0.62	0.43	0.78	0.91	0.64
	rs919766	C	0.12	0.24	0.62	0.84	0.81	0.67
IL1A	rs3783526	A	0.33	1.20	0.27	1.31	1.70	0.43
	rs1894399	A	0.22	1.60	0.21	0.71	2.38	0.31
	rs2856838	T	0.45	0.03	0.86	1.04	0.03	0.99
IL1B	rs1143643	A	0.39	0.01	0.93	0.98	0.31	0.86
ILR1	rs2160227	A	0.19	5.62	0.03	0.51	5.53	0.06
	rs951193	A	0.03	<0.01	0.99	1.00	1.00	0.60
	rs13020778	C	0.33	5.73	0.02	0.56	5.41	0.07
	rs2287047	T	0.26	2.37	0.12	0.67	2.54	0.28
	rs3917243	A	0.47	0.83	0.36	1.23	2.59	0.27
	rs3917246	T	0.26	0.90	0.34	1.28	0.92	0.63
	rs3917254	A	0.09	1.65	0.20	0.61	13.40	0.001
	rs3917267	A	0.47	3.72	0.05	1.56	4.04	0.13
	rs3917292	A	0.11	1.54	0.21	1.58	2.79	0.25
	rs3917296	G	0.13	1.14	0.29	1.46	4.62	0.10
	rs3917329	T	0.04	0.72	0.40	0.64	0.76	0.69
IL4	rs2227284	A	0.35	3.76	0.05	1.61	4.11	0.13
NFKBIA	rs1050851	T	0.16	0.46	0.50	0.81	0.81	0.67
	rs696	A	0.41	0.44	0.71	0.92	0.43	0.81
NFKBIE	rs730775	G	0.45	0.33	0.56	0.88	4.28	0.12
	rs2282151	C	0.24	1.00	0.32	1.31	1.38	0.50
NFKBIL2	rs7843998	C	0.49	<0.01	0.97	0.99	0.35	0.84
NFKBIZ	rs9841857	T	0.31	0.64	0.42	1.22	1.18	0.56
	rs7644388	T	0.31	0.58	0.45	1.21	0.86	0.65
	rs645781	C	0.26	0.04	0.85	1.05	13.86	0.001
	rs677011	G	0.37	0.01	0.91	1.03	9.06	0.01
	rs11718446	A	0.23	0.45	0.50	0.83	1.07	0.59

Abbreviations: CTL: control, IPD-WRF: Invasive Pneumococcal Disease patient without known risk factors, MAF: minimum allele frequency.

**Table 5. Summary of haplotype analyses comparing allelic frequencies between IPD patients and controls**

<b>CASES vs CONTROLS</b>		
<b>ILIR1*</b>	<b>AGCCACGGGAG</b>	<b>P= 0.05 (corrected p=ns)</b>
<b>NFKBIE**</b>	<b>GC</b>	<b>P= 0.03 (corrected p=ns)</b>

\*rs2160227|rs951193|rs13020778|rs2287047|rs3917243|rs3917246|rs3917254|rs3917267|rs3917292|rs3917296|rs391732

\*\* rs730775|rs2282151

## **Compliance with ethical standards**

The study was presented in part at the San Francisco at IDWeek October 2013 as oral communication.

**Funding:** This study was supported by a grant from the Institute Carlos III for biomedical research (PI11/02698).

**Conflict of Interest:** J. G. has received grants from Vifor Pharma, Bayer and Pfizer, and speaking engagements and conference invitations from Astellas, AstraZeneca, Novartis, Pfizer, GSK, Bayer, Vifor Pharma, Cubist, Durata and Theravance. E. C. has received grants, speaking engagements and conference invitations from Astellas, AstraZeneca, Novartis, Pfizer and MSD. All other authors: none to declare.

**Ethical approval:** The study was conducted in accordance with ethical principles set out in the latest version of the Declaration of Helsinki and the standard used for Good Clinical Practice, and was approved by the hospital Ethics and Research Committee.

**Informed consent:** Written informed consent was obtained from all patients.

## References

1. Kyaw MH, Christie P, Clarke SC, et al. Invasive pneumococcal disease in Scotland, 1999-2001: use of record linkage to explore associations between patients and disease in relation to future vaccination policy. *Clin Infect Dis* **2003**; 37:1283-91.
2. 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.
3. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* **2010**; 201:32-41.
4. Sangil A, Xercavins M, Rodríguez-Carballeira M, et al. Impact of vaccination on invasive pneumococcal disease in adults with focus on the immunosuppressed. *J Infect* **2015**; 71:422-7.
5. Gaschignard J, Levy C, Chrabieh M, et al. Invasive pneumococcal disease in children can reveal a primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis* **2014**; 59:244-51.
6. Lingappa JR, Dumitrescu L, Zimmer SM, et al. Identifying host genetic risk factors in the context of public health surveillance for invasive pneumococcal disease. *PLoS One* **2011**; 6:e23413.
7. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, et al. IkappaB genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**; 176:181-7.
8. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, et al. NFKBIZ polymorphisms and susceptibility to pneumococcal disease in European and African populations. *Genes Immun* **2010**; 11:319-25.
9. Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, et al. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**; 168:476-80.
10. Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:1599-604.
11. Wunderink RG, Waterer GW, Cantor RM, Quasney MW. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and the variable presentation and outcome of community-acquired pneumonia. *Chest* **2002**; 121:87S.
12. Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Elias SG, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Oxid Med Cell Longev* **2013**; 2013:371465.
13. Lemon JK, Miller MR, Weiser JN. Sensing of interleukin-1 cytokines during *Streptococcus pneumoniae* colonization contributes to macrophage recruitment and bacterial clearance. *Infect Immun* **2015**; 83:3204-12.
14. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, Roord JJ, Van Furth AM. IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol* **2003**; 170:4724-30.
15. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* **1997**; 17:1-32.
16. Bozza FA, Gomes RN, Japiassú AM, et al. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* **2004**; 22:309-13.
17. Kellum JA, Kong L, Fink MP, et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med* **2007**; 167:1655-63.
18. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax* **2003**; 58:154-6.
19. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, et al. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* **2004**; 172:7603-9.

20. Temple SE, Lim E, Cheong KY, et al. Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae*. *Immunogenetics* **2003**; 55:629-32.
21. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, et al. Genetic Variation in NFKBIE Is Associated With Increased Risk of Pneumococcal Meningitis in Children. *EBioMedicine* **2016**; 3:93-9.
22. Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* **2010**; 35:107-13.
23. Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, et al. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* **2003**; 112:1108-15.

## RESUM DELS RESULTATS

### **ESTUDI 1: «Aetiology of community-acquired pneumonia among adults in an H1N1 pandemic year: the role of respiratori viruses»**

Estudi prospectiu observacional en què s'inclouen 169 pacients ingressats entre els mesos de novembre del 2009 fins a l'octubre del 2010 a l'Hospital Universitari Mutua Terrassa per una PAC. D'aquests, 38 (22 %) són exclosos per manca de mostra respiratòria (esput), per la qual cosa la població finalment analitzada és de 131 pacients.

Fent ús dels mètodes convencionals (hemocultiu, cultiu d'esput, serologies aparellades i determinació dels antígens en orina per a *S. pneumoniae* i *Legionella pneumophila*) s'arriba a un diagnòstic etiològic en 66 dels 131 pacients (el 51 %). La incorporació de la PCR múltiple (Seegene®) ha permès arribar a un diagnòstic etiològic en 92 dels 131 pacients (el 70 %).

En relació amb la causa de la infecció, en un 34 % de les pneumònies (45 pacients) s'identifica un bacteri com a agent causal on el patògen més freqüent identificat és *S. pneumoniae*. En un 17 % (22 pacients) un o més virus; els patògens més freqüents són el VRS, en 7 casos, i el virus de la *Influenza* A o B, en 6 casos. En un 19 % (25 pacients) es documenta una coinfecció per virus i bacteris, i en el 30 % restant dels casos no s'arriba a cap diagnòstic etiològic.

La pneumònia viral presenta amb menys freqüència calfreds [4% enfront del 47 % ( $p = 0.001$ )], alhora que més miàlgia, rinorrea o odinofàgia [45 % enfront del 20 % ( $p = 0.04$ )], així com més tos seca [45 % enfront del 20 % ( $p = 0.04$ )].

Els nivells de procalcitonina són més baixos en pacients amb pneumònia viral en comparació amb els pacients amb pneumònia bacteriana [0.8 enfront de 10 mg/L ( $p = 0.03$ )]. Tant la gravetat mesurada com la presència de xoc, com el CURB, són més elevats en el cas de la pneumònia bacteriana que en la viral ( $p = 0.04$  i  $p = 0.02$ ).



Dels 12 pacients immunocompromesos inclosos en l'estudi, en 5 l'etiologia és bacteriana; en 2, viral; en altres 2 infeccions mixtes, i en 3 no s'assoleix el diagnòstic etiològic.

En una anàlisi *post hoc* descrivim un major nombre de casos d'etiologia viral en menors de 65 anys [26 % enfront del 10.4 % ( $p = 0.031$ )], juntament amb un menor diagnòstic etiològic en majors de 65 anys [37.7 % enfront del 18.5 % de diagnòstic desconegut ( $p = 0.021$ )].

## **ESTUDI 2: «Impact of vaccination on Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in adults with focus on the immunosuppressed»**

Estudi multicèntric observacional prospectiu on s'inclou un total de 799 episodis de malaltia pneumocòccica invasiva al llarg de quinze anys d'estudi (període 1999 - 2014). D'aquest total s'obté serotip en 694 episodis, que és la mostra final.

Definim com *pacient amb immunosupressió* aquell amb quimioteràpia activa per càncer, tractament immunosupressor per malaltia autoimmunitària, tractament biològic, tractament crònic amb corticoides, hemodiàlisi, neutropènia o infecció per VIH.

La cohort inclou un total de 694 episodis de malaltia pneumocòccica invasiva (MPI) en 693 pacients, dels quals 198 (28.5 %) es consideren immunodeprimits.

Es descriu una davallada de la incidència de l'MPI al llarg dels anys en tot el període d'estudi i en totes les edats, la qual és del 60 %: de 20/100 000 persones/any el 1999 fins a 8/100 000 persones/any el 2014 (Pearson,  $p < 0.004$ ).

Si analitzem la incidència d'MPI en els diferents grups d'edat, descrivim com en majors de 65 anys és més elevada que en la resta de la població, i posteriorment presenta una caiguda significativa, mentre que en la cohort de pacients d'entre 18 i 64 anys les incidències no mostren una disminució significativa.

La resistència a la penicil·lina definida pels punts de tall de meningitis segons la CLSI mostra una tendència a la disminució al llarg del període d'estudi ( $p=0.023$ ), dins un rang que va del 38 % a l'11 %.

La cobertura vacunal global considerant tot el període per la PCV7 és del 21.6 % enfront del 28.8 % comparant població general i immunodeprimits ( $p = 0.04$ ). I la cobertura vacunal global considerant tot el període per la PCV13 és del 64.5 % al 56.6 %, respectivament ( $p = 0.05$ ).

D'altra banda, la proporció de pacients amb MPI causades per serotips inclosos en la PCV7 i la PCV13 decreix de forma significativa durant el període d'estudi (Somers test:  $p < 0.05$ ).

### **ESTUDI 3: «Genetic susceptibility to invasive pneumococcal disease»**

En aquest estudi s'inclouen 144 pacients afectats per l'MPI aparellats per ètnia amb 280 controls. S'estudien 43 SNP de 10 gens candidats corresponents a proteïnes implicades en la resposta immune innata. En més del 90 % dels casos inclosos, l'MPI és atribuïble a PAC. Els casos s'agrupen en funció de la presència de factors de risc coneguts. Es defineixen els següents factors de risc coneguts per a la pneumònia: hàbit tabàquic, MPOC, asma, cirrosi hepàtica, esplenectomia o asplènia, malaltia autoimmune, hipogammaglobulinèmia o hipocomplementèmia, tumor sòlid o hematològic actiu, teràpies immunosupressores o biològiques, ús crònic de corticoides (més de 20 mg de prednisona/dia durant més de 15 dies), neutropènia i infecció per VIH.

En l'anàlisi simple es detecten diferències significatives en la distribució al·lèlica dels polimorfismes NFKBIA rs1050851 ( $p = 0.04$ ) i NFKBIE rs2282151 ( $p = 0.02$ ), raó per la qual s'associen a susceptibilitat a l'MPI.

Quan comparem les freqüències genotípiques trobem una associació estadísticament significativa entre la distribució genotípica d'NFKBIZ rs645781 i el risc d'MPI ( $p = 0.02$ ). També s'ha trobat una associació entre la distribució genotípica de la IL1R1 rs3917254 i l'MPI ( $p = 0,04$ ) i l'NFKBIZ rs645781 ( $\chi^2 = 8.25$ ,  $p = 0.02$ ).

L'anàlisi del subgrup de pacients sense factors de risc confirma que la distribució al·lèlica dels polimorfismes IL1R1 rs2160227 ( $\chi^2 = 5.62$ ,  $p = 0.03$ ), rs13020778 ( $\chi^2 = 5.73$ ,  $p = 0.02$ ), rs3917267 ( $\chi^2 = 3.72$ ,  $p = 0.05$ ) i IL4 rs2227284 ( $\chi^2 = 3.76$ ,  $p = 0.05$ ) estan associats a MPI. D'altra banda, la distribució genotípica d'IL10 rs3024509 ( $\chi^2 = 7.70$ ,

p = 0.02), IL1R1 rs3917254 ( $\chi^2 = 13.40$ , p = 0.001), NFKBIZ rs645781 ( $\chi^2 = 13.86$ , p = 0.001) i rs677011 ( $\chi^2 = 9.06$ , p = 0.01) també està associada amb els risc d'MPI. A més, els genotips de risc es presenten de forma relativament més freqüent en pacients sense factors de risc que en pacients amb factors de risc coneguts.

## DISCUSSIÓ

Establir el diagnòstic de la pneumònia aguda de la comunitat és un repte encara pendent de resoldre (21). Així doncs, els objectius d'aquesta tesi són, d'una banda, identificar els patògens que causen aquesta malaltia, així com els canvis epidemiològics, i de l'altra, descriure els factors genètics de l'hoste que potencialment predisposen al desenvolupament de la malaltia. El coneixement d'aquests elements pot condicionar de manera molt positiva una millora en el tractament i en el pronòstic d'aquesta entitat.

L'arribada a l'escenari clínic dels nous mètodes diagnòstics mitjançant la PCR ha aconseguit augmentar la identificació dels agents causals de la PAC. Malgrat això, encara estem molt lluny d'assolir unes xifres comparables a la que presenten moltes altres malalties infeccioses. Amb aquesta eina diagnòstica se'ns dibuixa un nou escenari clínic, amb el reconeixement de nous agents (els virus) que semblen desplaçar la que tradicionalment era reconeguda com la primera causa de la PAC: l'*S. pneumoniae* (3).

No obstant, hi ha hagut importants variacions en la literatura que convé analitzar. D'una banda, les relatives a la mostra utilitzada, que justifica en part la variabilitat observada en les taxes d'incidència reportada als estudis en què s'apliquen tècniques microbiològiques per a la identificació de la PAC viral. En el primer estudi presentat, es porta a terme la determinació per PCR de virus respiratoris mitjançant una mostra d'esput, tal com algun grup ha publicat recentment (Gadsby *et al.* (22)), en comptes de dur a terme un frotis nasofaringi, que és el que han fet altres autors (3, 23, 26, 27, 32, 33). Si bé un esput de qualitat és més difícil d'obtenir que el frotis nasofaringi, també és més representatiu de l'arbre respiratori inferior i, en aquest sentit, pot contribuir a distingir la potencial colonització del tracte respiratori superior de la infecció veritable al tracte respiratori inferior. En la literatura recent tenim dos treballs que clarament ens mostren la diferència entre una mostra i l'altra. En primer lloc, cal citar Gadsby *et al.* (22), autors ubicats a Escòcia, que només analitzen aquells pacients que han produït una mostra d'esput de qualitat. En aquesta sèrie s'assoleix un 87 % de diagnòstic

etiològic i els principals agents detectats són l'*Haemophilus influenzae* i l'*Streptococcus pneumoniae*. En segon lloc, Jain *et al.* (3), en l'àmbit nord-americà, inclou pacients de qui es recull una mostra de frotis nasofaringi. En aquest segon treball, els autors assolixen un 38 % de diagnòstic etiològic, i els virus constitueixen el primer grup etiològic, en el qual destaquen el *Rhinovirus* i la *Influenza*, seguits de l'*S. pneumoniae*. En el nostre cas, en què també s'utilitza com a mètode una mostra d'esput, l'*S. pneumoniae* ha estat el principal agent causal de PAC. Altres factors també poden justificar aquestes diferències: són especialment rellevants les variacions estacionals i l'àrea geogràfica relacionada amb l'entorn epidemiològic (per exemple, l'elevada taxa de virus identificats en l'estudi americà podria ser explicada parcialment atenent a la vacunació massiva antipneumocòccica infantil duta a terme per mitjà de la vacuna polisacàrida conjugada).

Un fet de gran interès per al metge assistencial són les diferents formes de presentació clínica que es produeixen segons si les PAC són bacterianes o virals. Els pacients amb pneumònia viral tenen una presentació clínica diferent de la bacteriana, amb més tos seca, cosa que pot explicar la major proporció de diagnòstic etiològic bacterià en estudis on la PCR es realitza sobre esput i no mitjançant frotis. Així mateix, hem trobat altres diferències, com ara una major presència de rinorrea, miàlgia o odinofàgia en la pneumònia viral, i una major presència de calfreds en la bacteriana. Aquestes diferències en la forma de presentació també han estat descrites per altres autors, com Lee *et al.* (88), que detecta una major incidència de sibilàncies en els pacients amb infecció per VRS respecte dels pacients amb infecció per *Influenza*, els quals, a l'hora, presenten més febre, o com Bewick *et al.* (89), qui descriu una escala en la qual intenta predir el risc d'*Influenza*. Tots aquests treballs, però, tenen determinades limitacions: la principal és el fet que no es pot descartar la coinfecció (90). Una altra de les troballes més rellevants és el fet que descrivim una menor resposta inflamatòria en els pacients afectats de pneumònia viral, en qui s'observa una proteïna C reactiva menor i una procalcitonina significativament menor en comparació amb els casos de pneumònia bacteriana. Tot i així, el paper de la procalcitonina en el maneig de la PAC segueix estant sotmès a debat (91, 92).

Pel que fa a l'etiologia de la PAC, hi ha factors de l'hoste que en part poden explicar una major predisposició. En una anàlisi *post hoc* descrivim una major freqüència d'etiologia bacteriana en pacients més grans de 65 anys. A més, en el subgrup de pacients immunocompromesos trobem un 42 % amb etiologia bacteriana, una proporció superior a la descrita en comparació amb la resta de població. Malgrat que el nombre de pacients inclosos és petit, aquest descobriment demostra que l'hoste té un paper clau en el risc de desenvolupament de la malaltia.

És d'especial interès el fenomen de la coinfecció viral-bacteriana. En la nostra mostra la coinfecció és identificada en un 19 % dels casos (25 pacients) i les combinacions més freqüents són *S. pneumoniae* i el *Rhinovirus*, i *S. pneumoniae* i el *Coronavirus*. No podem esbrinar si la infecció viral precedeix la bacteriana o si totes dues actuen simultàniament, i saber-ho seria de gran ajuda a l'hora d'entendre la fisiopatogènia de la infecció. Existeix evidència en estudis clínics que donen suport al paper patògen dels virus com a coagents causants de la PAC en combinació amb bacteris. Morens *et al.* (93) han analitzat dades de les pandèmies per *Influenza* del 1918, 1957 i 1968 i suggereixen que la majoria de morts durant aquells períodes eren degudes a coinfeccions secundàries a bacteris. En la literatura recent les coinfeccions més freqüentment descrites són la combinació d'*S. pneumoniae* i *Influenza* i d'*S. pneumoniae* i *Rhinovirus* (94,95). Els percentatges descrits en la literatura de coinfecció van d'un 3 % a un 26.5 %; similars, per tant, als nostres resultats (3, 23, 26, 27, 32, 33). D'altra banda, hi ha evidència que les infeccions mixtes (virus amb bacteri) es presenten amb una gravetat i una morbiditat més elevades (2, 96). Tot i els avenços assolits fins ara, calen més estudis per conèixer el pes dels virus en l'etiologia i la patogènesi de la pneumònia. La identificació definitiva d'aquests agents com a causa de la PAC podria ajudar a fer un ús més racional dels antibiòtics en el tractament d'aquesta entitat.

En aquest context epidemiològic canviant, s'hi barregen dues situacions: d'una banda, hem millorat la nostra capacitat diagnòstica, la qual cosa situa la infecció viral en el punt de mira; de l'altra, la pressió que ha exercit la vacunació amb vacuna conjugada en la població infantil ha modificat la incidència de l'MPI. En l'estudi que respon al segon objectiu d'aquesta tesi descrivim com en un període de 15 anys es produeix una

disminució progressiva de la incidència d'MPI, fet que també ha estat descrit en la literatura científica en altres àmbits geogràfics (42-45).

Les causes potencials d'aquesta caiguda de la incidència són múltiples i diverses. En primer lloc, tal com hem esmentat, la introducció de les vacunes conjugades en la població infantil probablement ha modificat la freqüència i el tipus de serotips colonitzadors. En el nostre entorn, la reducció de la incidència és a costa de la disminució dels serotips vacunals de la PCV7 i, en un menor grau, de la dels serotips de la PCV13. Val a dir que el període d'estudi va des del 1999 fins al 2014 i que la introducció de la PCV7 i de la PCV13 van tenir lloc el 2001 i el 2010, respectivament. És probable que el fet que les vacunes no hagin estat finançades pel sistema públic de salut fins fa poc temps hagi provocat que el compliment sigui erràtic. És ben conegut que el grau d'immunitat d'un grup depèn de la cobertura vacunal inicial i de la quantitat de població vacunada acumulada. Alguns autors han descrit una reducció significativa de la incidència de l'MPI entre el primer i el segon any a partir de la introducció de la vacuna conjugada en llocs on la implementació és finançada i, per tant, és pràcticament universal entre la població infantil (42, 97). Al 2004, el nostre grup va analitzar la incidència de l'MPI en nens menors de 5 anys: no vam demostrar una caiguda de la incidència comparant el període 1999-2001 (prevacunal) i el 2002-2004 (postvacunal). Llavors la taxa de vacunació infantil en la nostra àrea va passar del 4.8 % al 2002 al 34 % el 2006. Així doncs, en àrees com Catalunya, caracteritzades per una baixa taxa de vacunació infantil amb vacuna polisacàrida conjugada, el període de temps necessari per detectar una caiguda en la taxa d'incidència de l'MPI pot ser més llarg (59).

En la nostra cohort un terç dels pacients adults amb MPI són immunodeprimits. La presentació clínica i la distribució dels serotips en aquest grup en comparació amb la població general presenten unes característiques diferents. La bacterièmia sense focus aparent és més prevalent i la gravetat i la mortalitat són més altes en aquest grup. A més, la cobertura vacunal oferida per la PCV13 és menor, i els serotips altament invasius (1,5 i 7F) estan menys representats en aquest grup. Aquest fet ja va ser descrit per Harboe *et al.* (98), qui va reportar que determinades comorbiditats predisposaven de forma diferent a infeccions per a certs serotips, i per Alanee *et al.* (41), que va

descriure com els serotips altament invasius rarament causen infecció en la població immunodeprimida. La petita mostra emprada en el nostre estudi no permet realitzar una anàlisi multivariant que pugui correlacionar serotips específics amb comorbiditats o mortalitat.

Els serotips no vacunals experimenten un increment progressiu en la seva incidència tant en la població immunodeprimida com en la general, i representen un 40 % del total de casos. Aquests resultats són importants a l'hora de quantificar el benefici de la vacunació en adults. Sembla, doncs, una solució millor promoure una vacunació infantil massiva que garanteixi l'eliminació del reservori, que no pas vacunar selectivament determinats adults quan la protecció que ofereix la vacuna pot anar progressivament decaient (99). A més, si a aquest fet hi afegim que la vacunació infantil proporciona immunitat de grup, la capacitat preventiva de la PCV13 en adults encara pot ser menys rellevant. Davant aquesta situació, queda clar que l'impacte de la vacunació infantil sobre l'epidemiologia de la malaltia fa obligatori consolidar els sistemes de vigilància poblacional d'alta qualitat amb taxes d'MPI i serotips de forma específica, així com monitorar-ne l'evolució. Cal també valorar la possible necessitat d'una vacuna conjugada exclusiva per a adults mentre simultàniament fem servir la PCV13 en nens (100). En l'àrea de Catalunya, des de l'Agència de Salut Pública es va iniciar al 2016 una cohort prospectiva per realitzar aquest registre (101).

En la nostra cohort no trobem canvis quant a la mortalitat ni en la forma de presentació clínica tot i el reemplaçament de serotips. Sabem que la gravetat i la mortalitat de l'MPI depenen de la presentació clínica, dels serotips i de les característiques de l'hoste. Burgos *et al.* (46) descriu un increment de les taxes de xoc en els pacients amb MPI després de la introducció de la PCV7. Aquesta cohort inclou 653 pacients, un 35 % dels quals immunodeprimits. En canvi, Harboe *et al.* (45) (en el seu cas inclogué tota la població de Dinamarca) va trobar una disminució del 30 % de la mortalitat relacionada amb MPI després de la PCV7 i la PCV13. Tot i així, necessitem més estudis a fi d'entendre les implicacions potencials derivades dels canvis de serotips i les associacions amb característiques clíniques de cadascun d'aquests.



Finalment, en el segon estudi també descrivim una disminució de la resistència a la penicil·lina que va en la línia publicada en altres treballs (102, 103). Existeixen diverses hipòtesis que poden justificar aquesta reducció, la primera de les quals és que la vacunació ha provocat una disminució dels portadors nasofaringis de serotips de pneumococ resistents a la penicil·lina. Aquest fet l'ha descrit Richter *et al.* (104) als EUA, on observa una disminució de la resistència a la penicil·lina, que atribueix a la disminució del serotip 19A (que comporta un 25 % dels pneumococs resistents a la penicil·lina); per tant, l'atribueix a l'eficàcia de la PCV13. D'altra banda, la disminució progressiva del consum d'antibiòtics, sobretot de penicil·lines, a canvi d'un augment d'ús de quinolones per a les infeccions respiratòries també pot explicar aquest fenomen (105).

Un actor principal en l'escenari de l'MPI és l'hoste. Sabem que l'MPI té una major incidència en els extrems de la vida, fet que justifica els criteris de vacunació poblacional.

És ben conegut que hi ha una predisposició genètica a la malaltia infecciosa en general. Sorensen *et al.* (62) va reconèixer que la mort prematura té un important component genètic, especialment les de causa vascular o infecciosa. Aquesta discussió ja ocupava els científics de finals del segle XIX. En plena deliberació acadèmica sobre el paper dels bacteris com a agents causals de malaltia, el 7 d'octubre del 1892 un higienista bavarès, Max Joseph Pettenkofer, es va beure un còctel de còlera preparat pel bacteriòleg Robert Koch davant una multitud horroritzada a fi de demostrar que els bacteris no tenien cap paper patogen. Pettenkofer no va contraure la malaltia i va utilitzar aquest triomf per explicar el pes de la predisposició de l'hoste en el desenvolupament de les malalties per damunt del potencial paper dels bacteris (106).

*L'S. pneumoniae* pot passar d'una colonització transitòria i una resolució de l'estat de portador del patogen a la nasofaringe a una invasió agressiva que culmini en el desenvolupament de la malaltia, sèpsia i, inclús, la mort. La interacció entre la immunitat i la capacitat d'adherència i invasió del microorganisme són factors clau per entendre aquest ventall d'interaccions entre l'hoste i el patogen. El sistema immune innat representa el primer pas no específic en la defensa de l'hoste. Encara tenim

dificultats per resoldre els diferents patrons de la resposta de l'hoste. En l'estudi que pretén respondre el tercer objectiu, investiguem la influència de 43 SNP en 10 gens immunològics (IL10, IL12B, IL1A, IL1B, IL1R1, IL4, NFKBIA, NFKBIE, NFKBIL2 i NKFBIZ) sobre el risc de desenvolupar MPI. Trobem determinades associacions entre variants dels gens IL1R1, IL4, IL10, NFKBIE, NFKBIA i NFKBIZ i el risc de patir MPI.

Diversos polimorfismes d'IL1R1 es troben associats amb el risc de patir MPI quan comparem la distribució genotípica dels pacients amb MPI respecte dels controls (rs3917254), i quan comparem la distribució genotípica i al·lèlica entre els pacients amb MPI sense factors de risc coneguts per a la MPI i els subjectes control (rs2160227, rs13020778, rs3917254 i 3917267). Aquests polimorfismes són variants intròniques de funció desconeguda, tot i que la zona pot afectar la regulació de la transcripció. Un estudi dut a terme en individus americans d'origen europeu descriu una associació entre la IL1R1 rs2160227 i l'MPI (79); per bé que nosaltres no repliquem els seus resultats respecte de l'associació entre el polimorfisme rs2287047, sí que ens confirma el paper important de IL1R1 en l'MPI. Probablement, les diferències entre la mostra i el grup de població poden explicar aquesta discrepància. En qualsevol cas, aquestes troballes reforcen la hipòtesi que les variants genètiques de la IL1R1 poden tenir un paper rellevant en la predisposició a l'MPI. Això és plausible biològicament si tenim en compte que la IL1R1 és un mediador important de l'activitat de la IL1 $\alpha$  i la IL1 $\beta$ . S'ha descrit més temps de colonització per l'*S. pneumoniae* en rates amb dèficit d'IL1-1R (receptor de la IL1 tipus 1), juntament amb una major susceptibilitat a la meningitis pneumocòccica en comparació amb la que tenen rates salvatges (107- 108).

Així mateix, trobem associacions entre l'MPI i el gen de la interleuquina 4 (IL4). Trobem una associació amb la distribució genotípica de l'SNP rs2227284 quan avaluem els pacients sense factors de risc coneguts per a MPI. Però, d'altra banda, no detectem cap associació amb variants intròniques quan analitzem tota la cohort. El polimorfisme rs243302 s'ha descrit prèviament associat a l'MPI en una cohort de població americana d'origen europeu (79). La IL4 és un factor molt important en l'activació i la diferenciació de les cèl·lules  $\beta$ . Nivells elevats d'IL4 mRNA estan associats a una major supervivència en rates en un model murí de pneumònia pneumocòccica (109). La IL4 i altres citocines s'han demostrat associades amb la gravetat de la sèpsia, la fallida

orgànica i la mort en pacients amb xoc sèptic (110). Tot i que està descrit que la IL4 juga un paper rellevant en la patogènesi de la sèpsia i la inflamació, la manera concreta com participa en el decurs de la infecció pneumocòccica és encara poc coneguda.

La distribució genotípica d'IL10 rs3024509 també està associada amb el risc d'MPI en la cohort estudiada ( $p = 0.02$ ). Aquesta associació només s'ha trobat en pacients sense factors de risc coneguts per a l'MPI. El polimorfisme rs3024509 és una variant intrònica de funcionalitat desconeguda i la seva contribució a la malaltia encara no està clara. La IL10 és una citocina antiinflamatòria i sabem que té un paper important en la resposta immune innata. Els nivells d'IL10 correlacionen amb la intensitat de la resposta inflamatòria, la gravetat i l'evolució clínica de la sèpsia, el xoc sèptic i la PAC (74, 111, 112). Mutacions genètiques de la IL10 s'han associat amb una major eliminació d'IL10 i un augment de xoc sèptic en l'MPI (74). A més, nivells elevats d'IL10 s'han associat amb cursos fulminants d'infecció per *S. pneumoniae* en models murins en pneumònies pneumocòcciques post-*Influenza* (113, 114).

Per acabar, la distribució genotípica del polimorfisme NFKBIZ (rs645781) s'associa amb el risc d'MPI en la nostra cohort. La significació estadística de l'associació augmenta quan només considerem els pacients sense factors coneguts de risc per a l'MPI. El polimorfisme rs645781 és una variant intrònica la funcionalitat de la qual roman desconeguda. Un estudi previ realitzat en població americana d'origen europeu va trobar que hi havia associació entre el polimorfisme NFKBIZ rs600718 i l'MPI (63). La distribució al·lèlica de dues variants dels gens NFKBIA (rs1050851) i NFKBIE (rs2282151) també s'ha trobat associada a la susceptibilitat de tenir MPI. Estudis previs havien identificat una associació entre altres variants genètiques de l'NFKBIE i el risc d'infecció pneumocòccica en nens (115), així com entre variants genètiques de l'NFKBIA (rs3138053 i rs2233406) amb protecció enfront de l'MPI. Els gens NFKBIA, NFKBIE i NFKBIZ codifiquen la família dels inhibidors NF $\kappa$ B. Els NF $\kappa$ B són essencials per a l'expressió de citocines, el reclutament de neutròfils i la mort bacteriana en la pneumònia pneumocòccica. La seva regulació genètica és extremadament complexa: d'una banda, hi ha una clara associació entre l'alteració de l'activació d'NF $\kappa$ B com a causa d'immunodeficiència (116), però, de l'altra, nivells elevats d'NF $\kappa$ B estan associats a una pitjor evolució en la sèpsia (67).

Així doncs, en la cohort estudiada trobem diferents marcadors genètics associats al risc de patir MPI. Aquest marcadors, en cas que siguin validats en noves cohorts, podrien arribar a constituir una eina per identificar poblacions susceptibles de beneficiar-se de mesures preventives.



## CONCLUSIONS

### **ESTUDI 1: «Aetiology of community-acquired pneumonia among adults in an H1N1 pandemic year: the role of respiratori viruses»**

- Conclusió 1: *L'S. pneumoniae* segueix sent la causa més freqüent de PAC en el nostre medi.
- Conclusió 2: La PCR múltiple augmenta significativament la proporció de diagnòstics microbiològics i permet la identificació d'una infecció viral en més d'un terç dels casos.
- Conclusió 3: Hi ha diferències en la forma de presentació clínica, la gravetat i els valors de la procalcitonina entre els pacients amb pneumònia viral i els que tenen pneumònia bacteriana, fet que podria ajudar a dissenyar les pautes de tractament empíric.

### **ESTUDI 2: «Impact of vaccination on invasive pneumococcal disease in adults with focus on the immunosuppressed»**

- Conclusió 4: En el nostre medi, caracteritzat per una implementació de la vacunació de la població infantil lenta i progressiva, hem descrit una disminució de la incidència de l'MPI en els adults, tant ens els immunosuprimits com en els no immunosuprimits.
- Conclusió 5: Atesa l'evolució dels serotips vacunals, la cobertura vacunal que ofereix la PCV13 en la població immunosuprimida pot arribar a ser subòptima al llarg dels propers anys.

### **ESTUDI 3: «Genetic susceptibility to invasive pneumococcal disease»**

- Conclusió 6: Hem descrit una associació entre diferents variants genètiques de citocines clau en la resposta immune innata, com la IL1R1, la IL4 i la IL10, així com els gens de IKB (NFKBIE, NFKBIA i NFKBIZ), i el risc de malaltia pneumocòccica invasora.



## REFERÈNCIES

1. Hipòcrates. Hipòcrates, Règim en les malalties agudes.
2. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings L C, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011;377(9773):1264-75.
3. Jain S, Self WH, Wunderink R G, Fakhran S, Balk R, Bramley A M, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med*. 2015;373(5):415-27.
4. Musher DM, Roig IL, Cazares G, Stager CE, Logan N, Safar H. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study. *J Infect*. 2013 ;67(1):11-8.
5. Musher DM, Thorner AR. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 2015 ;372(3):294.
6. Said M A, Johnson HL, Nonyane BAS, Deloria-Knoll M, O'Brien KL, AGEDD Adult Pneumococcal Burden Study Team, et al. Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS One*. 2013;8(4):e60273.
7. Musher DM, McKenzie SO. Infections due to *Staphylococcus aureus*. *Medicine (Baltimore)*. 1977;56(5):383-409.
8. Nicolás Sánchez F J, Vilá Justribó M, Merino Laborda MT, Rubio Caballero M. Valor de la punció transtoràcica aspirativa en el diagnòstic etiològic de la pneumònia nosocomial de los pacientes no ingresados en UCI. *Arch Bronconeumol*. 2000;36(8):429-35.
9. Sahn SA. State of the art. The pleura. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138(1):184-234.
10. Manuel Porcel J, Vives M, Esquerda A, Ruiz A. Usefulness of the British Thoracic Society and the American College of Chest Physicians guidelines in predicting pleural drainage of non-purulent parapneumonic effusions. *Respir Med*. 2006 ; 100(5):933-7.
11. Murdoch DR, Jennings LC, Bhat N, Anderson TP. Emerging advances in rapid diagnostics of respiratory infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(3):791-807.
12. Ruohola A, Waris M, Allander T, Ziegler T, Heikkinen T, Ruuskanen O. Viral etiology of common cold in children, Finlàndia. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(2):344-6.
13. Heikkinen T, Marttila J, Salmi A A, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4337-9.
14. Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, Steinberg R, Shemer-Avni Y. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3439-43.



15. Gutiérrez F, Masiá M, Rodríguez JC, Ayelo A, Soldán B, Cebrián L, *et al.* Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin Infect Dis.* 2003;36(3):286-92.
16. Blázquez RM, Espinosa FJ, Martínez-Toldos CM, Alemany L, García-Orenes MC, Segovia M. Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella pneumoniae* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(7):488-91.
17. Ruiz MP, Gámez SS, Ángel M, Clavero J. Tratado de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2012; 29 (Suppl. 5):21-6.
18. Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, *et al.* New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Baltimore).* 1990;69:307-16.
19. Camarelles Guillem F, Dalmau González-Gallarza R, Clemente Jiménez L, Díaz-Maroto Muñoz J L., Lozano Polo A, Pinet Ogué M. C. Documento de Consenso para la atención clínica al tabaquismo en España. Comité Nacional para la Prevención del Tabaquismo. *Med Clin (Barc).* 2013;140(6):272.e1-272.e12.
20. Musher DM, Thorner AR. Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med.* 2014; 371(17):1619-28.
21. Garau J, Calbo E. Community-acquired pneumonia. *Lancet.* 2008; 371(9611):455-8.
22. Gadsby NJ, Russell CD, Mchugh MP, Mark H, Morris AC, Laurenson IF, *et al.* Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2016;62(7):817-23.
23. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis.* 2010;50(2):202-9.
24. Garcia-Vidal C, Labori M, Viasus D, Simonetti A, Garcia-Somoza D, Dorca J, *et al.* Rainfall is a risk factor for sporadic cases of *legionella pneumophila pneumoniae*. *PLoS One.* 2013;8(4):e61036.
25. Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr. Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, *et al.* Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization: results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Arch Intern Med.* 1997;157(15):1709-18.
26. Templeton KE, Scheltinga S A, van den Eeden WC, Graffelman AW, van den Broek PJ, Claas ECJ. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* 2005;41(3):345-51.
27. Ángeles Marcos M, Camps M, Pumarola T, Antonio Martinez J, Martinez E, Mensa , *et al.* The role of viruses in the aetiology of community-acquired pneumonia in adults. *Antivir Ther.* 2006;11(3):351-9.

28. Lieberman D, Shimoni A, Shemer-Avni Y, Keren-Naos A, Shtainberg R, Lieberman D. Respiratory viruses in adults with community-acquired pneumonia. *Chest*. 2010;138(4):811-6.
29. Rhedin S, Lindstrand A, Hjelmgren A, Ryd-Rinder M, Öhrmalm L, Tolfvenstam T, *et al*. Respiratory viruses associated with community-acquired pneumonia in children: matched case-control study. *Thorax* 2015;70(9):847-53.
30. Gu L, Qu J, Sun B, Yu X, Li H, Cao B. Sustained viremia and high viral load in respiratory tract secretions are predictors for death in Immunocompetent adults with adenovirus pneumonia. *PLoS One*. 2016; 11(8):e0160777.
31. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, *et al*. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis*. 2007 ; 44(Suppl. 2):S27-72.
32. Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RT R, Werno AM, *et al*. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. *Thorax*. 2008;63(1):42-8.
33. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie T J. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. *Chest* .2008;134(6):1141-8.
34. Falsey A. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *Exp Lung Res*. 2005;31 (Suppl. 1):77.
35. Boivin G, De Serres G, Hamelin ME, Côté S, Argouin M, Tremblay G, *et al*. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis*. 2007;44(9):1152-8.
36. Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 18 ed. Madrid: Mc Graw Hill; 2012.
37. Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* . 2001;357(9260):950-2.
38. Frolet C, Beniazza M, Roux L, Gallet B, Noirclerc-Savoie M, Vernet T, *et al*. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol*. 2010;10(1):190.
39. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* . 2008;6(4):288-301.
40. Sjostrom K, Spindler C, Ortqvist A, Kalin M, Sandgren A, Kuhlmann-Berenzon S, *et al*. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis*. 2006;42(4):451-9.
41. 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*. 2007;45(1):46-51.

42. Feikin DR, Kagucia EW, Loo JD, Link-Gelles R, Puhan MA, Cherian T, *et al.* Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med* . 2013;10(9):e1001517.
43. Harboe ZB, Benfield T L, Valentiner-Branth P, Hjuler T, Lambertsen L, Kaltoft M, *et al.* Temporal trends in invasive pneumococcal disease and pneumococcal serotypes over 7 decades. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):329-37.
44. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, *et al.* Sustained reductions in Invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 2010;201(1):32-41.
45. Harboe ZB, Dalby T, Weinberger DM, Benfield T, Molbak K, Slotved HC, *et al.* Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in invasive pneumococcal disease incidence and mortality. *Clin Infect Dis*. 2014;59(8):1066-73.
46. Burgos J, Falcó V, Borrego A, Sordé R, Larrosa MN, Martínez X, *et al.* Impact of the emergence of non-vaccine pneumococcal serotypes on the clinical presentation and outcome of adults with invasive pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(4):385-91.
47. Lepoutre A, Varon E, Georges S, Gutmann L, Lévy-Bruhl D. Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001-2006. *Euro Surveill*. 2008;13(35).
48. Muñoz-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*. 2008;46(2):174-82.
49. Heffron R, Varley FM. A study of lobar pneumonia in Massachusetts: methods and results of pneumococcus type determination, 1931-1932. *Am J Public Health Nations Health*. 1932;22(12):1230-48.
50. Roche PW, Krause V, Cook H, Barralet J, Coleman D, Sweeny A, *et al.* Invasive pneumococcal disease in Australia, 2006. *Commun Dis Intell Q Rep*. 2008;32(1):18-30.
51. Pitsioui GG, Kioumis IP. Pneumococcal vaccination in adults: does it really work?. *Respir Med*. 2011;105(12):1776-83.
52. Simberkoff MS, El Sadr W, Schiffman G, Rahal JJ. Streptococcus pneumoniae infections and bacteremia in patients with acquired immune deficiency syndrome, with report of a pneumococcal vaccine failure. *Am Rev Respir Dis*. 1984;130(6):1174-6.
53. Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, Lahart C, Lacke C, Groover J, Watson D, *et al.* Antibody to capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J Infect Dis*. 1992;165(3):553-6.

54. Pedersen R, Lohse N, Østergaard L, Søgaaard O. The effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccination in HIV-infected adults: a systematic review. *HIV Med.* 2011;12(6):323-33.
55. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 2000;30(1):100-21.
56. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 2011;378(9807):1962-73.
57. Generalitat de Catalunya. Agència de Salut Pública. Indicacions de la vacuna antipneumocòccica a Catalunya. Disponible a:  
[http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut\\_responsiu/salutAZ/V/vacunacions/documents/prevencio\\_neumo\\_catalunya\\_adults.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut_responsiu/salutAZ/V/vacunacions/documents/prevencio_neumo_catalunya_adults.pdf). (Consulta gener 2017)
58. Tsigrelis C, Tleyjeh IM, Lahr BD, Nyre LM, Virk A, Baddour LM. Decreases in case-fatality and mortality rates for invasive pneumococcal disease in Olmsted County, Minnesota, during 1995-2007: a population-based study. *Clin Infect Dis.* 2008;47(11):1367-71.
59. Calbo E, Díaz A, Cañadell E, Fábrega J, Uriz S, Xercavins M, *et al.* Invasive pneumococcal disease among children in a health district of Barcelona: early impact of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(9):867-72.
60. Muhammad R D, Oza-Frank R, Zell E, Link-Gelles R, Narayan KMV, Schaffner W, *et al.* Epidemiology of invasive pneumococcal disease among high-risk adults since the introduction of pneumococcal conjugate vaccine for children. *Clin Infect Dis.* 2013;56(5):e59-67.
61. Gaschignard J, Levy C, Chrabieh M, Boisson B, Bost-Bru C, Dauter S, *et al.* Invasive pneumococcal disease in children can reveal a primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis.* 2014;59(2):244-51.
62. Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med.* 1988;318(12):727-32.
63. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Rautanen A, Segal S, Moore CE, *et al.* NFKBIZ polymorphisms and susceptibility to pneumococcal disease in European and African populations. *Genes Immun.* 2010;11(4):319-25.
64. 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.* 2002;359(9317):1569-73.
65. Austrian R, Gold J. Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med.* 1964 ;60:759-76.
66. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789-96.

67. Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(2):107-13.
68. Calbo E, Alsina M, Rodríguez-Carballeira M, Lite J, Garau J. The impact of time on the systemic inflammatory response in pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J*. 2010;35(3):614-8.
69. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012;14(4):460-6.
70. Yuan FF, Marks K, Wong M, Watson S, de Leon E, McIntyre PB, *et al*. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol*. 2008;86(3):268-70.
71. Li Q, Verma IM. NF-κB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 ;2(10):725-34.
72. Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF-κB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol*. 2005;175(11):7530-5.
73. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med*. 2010;363(1):87-9.
74. Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, *et al*. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* . 2003;168(4):476-80.
75. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Frodsham A, Walley A, Maskell NA, *et al*. IkappaB genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(2):181-7.
76. Moens L, Verhaegen J, Pierik M, Vermeire S, De Boeck K, Peetermans WE, *et al*. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in invasive pneumococcal disease. *Microbes Infect*. 2007;9(1):15-20.
77. Smelaya TV, Belopolskaya OB, Smirnova SV, Kuzovlev AN, Moroz V V, Golubev AM, *et al*. Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci Rep*. 2016;6:35021.
78. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, *et al*. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet*. 2007;39(4):523-8.
79. 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. *PLoS One*. 2011;6(8):e23413.
80. Yee AM, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between FcγRIIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2000;30(1):25-8.

81. Yuan FF, Wong M, Pererva N, Keating J, Davis AR, Bryant JA, *et al.* Fcγ<sub>2</sub>RIIA polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(3):192-5.
82. Moens L, Van Hoeyveld E, Peetermans WE, De Boeck C, Verhaegen J, Bossuyt X. Mannose-binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum Immunol.* 2006;67(8):605-11.
83. Moens L, Van Hoeyveld E, Verhaegen J, De Boeck K, Peetermans WE, Bossuyt X. Fcγ<sub>2</sub>-receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol.* 2006;118(1):20-3.
84. 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.* 2002;185(10):1517-20.
85. Roy S, Hill AVS, Knox K, Griffiths D, Crook D. Research pointers: association of common genetic variant with susceptibility to invasive pneumococcal disease. *BMJ.* 2002;324(7350):1369.
86. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Maskell NA, Davies CWH, Hedley EL, *et al.* PTPN22 and invasive bacterial disease. *Nat Genet.* 2006;38(5):499-500.
87. Chapman S J, Vannberg FO, Khor CC, Segal S, Moore CE, Knox K, *et al.* Functional polymorphisms in the FCN2 gene are not associated with invasive pneumococcal disease. *Mol Immunol.* 2007;44(12):3267-70.
88. Lee N, Lui GCY, Wong KT, Li TCM, Tse ECM, Chan JY C., *et al.* High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(8):1069-77.
89. Bewick T, Myles P, Greenwood S, Nguyen-Van-Tam JS, Brett SJ, Semple MG, *et al.* Clinical and laboratory features distinguishing pandemic H1N1 influenza-related pneumonia from inter-pandemic community-acquired pneumonia in adults. *Thorax.* 2011;66(3):247-52.
90. Calbo E, Robles A, Sangil A, Benet S, Viladot ME, Pascual V, *et al.* H1N1 influenza pneumonia and bacterial coinfection. *Thorax.* 2011;66(12):1091-2.
91. Schuetz P, Briel M, Mueller B. Clinical outcomes associated with procalcitonin algorithms to guide antibiotic therapy in respiratory tract infections. *JAMA.* 2013;309(7):717.
92. Gilbert DN. Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2325-9.
93. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008;198(7):962-70.
94. Blyth CC, Webb SAR, Kok J, Dwyer DE, van Hal SJ, Foo H, *et al.* The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7(2):168-76.

95. Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, *et al.* Streptococcus pneumoniae coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One.* 2009;4(12):e8540.
96. Martin-Loeches I, J Schultz M, Vincent JL, Alvarez-Lerma F, Bos LD, Solé-Violán J, *et al.* Increased incidence of co-infection in critically ill patients with influenza. *Intensive Care Med.* 2017;43(1):48-58.
97. Harboe ZB., Valentiner-Branth P, Benfield TL, Christensen JJ, Andersen PH, Howitz M, *et al.* Early effectiveness of heptavalent conjugate pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal disease after the introduction in the Danish Childhood Immunization Programme. *Vaccine.* 2010;28(14):2642-7.
98. Harboe Z.B, 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.* 2009;6(5):e1000081.
99. Center of Disease Control and Prevention. Vaccine Recommendations of the ACIP. Pneumococcal ACIP Vaccine recommendations. 2015. Disponible a: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/vacc-specific/pneumo.html> (Consulta novembre de 2016)
100. Weinberger DM, Harboe ZB, Shapiro ED. Developing better pneumococcal vaccines for adults. *JAMA Intern Med.* 2017;177(3):303-4.
101. Generalitat de Catalunya. Secretaria de Salut Pública. Epidemiologia de la malaltia pneumocòcica invasiva a Catalunya. Informe 2012-2014. Disponible a: [http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home\\_canal\\_salut/professionals/temes\\_de\\_salut/vigilancia\\_epidemiologica/documents/arxius/malaltia\\_neumococica\\_invasiva\\_informe\\_2012\\_2014.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/vigilancia_epidemiologica/documents/arxius/malaltia_neumococica_invasiva_informe_2012_2014.pdf). (Consulta gener 2017)
102. Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, *et al.* Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(7):2953-9.
103. Hampton LM, Farley MM, Schaffner W, Thomas A, Reingold A, Harrison LH, *et al.* Prevention of antibiotic-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae with conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 2012;205(3):401-11.
104. Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Doern GV. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(11):6484-9.

105. Oteo J, Lázaro 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*. 2004;42(12):5571-7.
106. Lawrence K. Altman. *Who Goes First?: The Story of Self-experimentation in Medicine*. Berkeley: University of California Press; 1987: p. 24-25.
107. Lemon JK, Miller MR, Weiser JN. Sensing of interleukin-1 cytokines during *Streptococcus pneumoniae* colonization contributes to macrophage recruitment and bacterial clearance. *Infect Immun*. 2015;83(8):3204-12.
108. Zwijnenburg PJG, van der Poll T, Florquin S, Roord JJ, Van Furth AM. IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol*. 2003;170(9):4724-30.
109. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol*. 1997;17(1):1-32.
110. Bozza FA, Gomes RN, Japiassú AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*. 2004;22(4):309-13.
111. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, *et al*. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*. 2007;167(15):1655-63.
112. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, Bella A, Greene CM, McElvaney NG, *et al*. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax*. 2003;58(2):154-6.
113. van der Sluijs KF, van Elden LJR, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, *et al*. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol*. 2004;172(12):7603-9.
114. Temple SEL, Lim E, Cheong KY, Almeida CAM, Price P, Ardlie KG, *et al*. Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae*. *Immunogenetics*. 2003;55(9):629-32.
115. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, Hollegaard MV, Sørensen HT, Hougaard DM. *et al*. Genetic variation in NFKBIE is associated with increased risk of pneumococcal meningitis in children. *EBioMedicine*. 2016;3:93-9.
116. Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Döffinger R, Cancrini C, Bonnet M, *et al*. A hypermorphic I $\kappa$ B $\alpha$  mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest*. 2003;112(7):1108-15.



117. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets-An updated view. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:165974.