

PROTOCOLO

Título del estudio	Colonización por <i>S. pneumoniae</i> en niños españoles sanos menores de 5 años y con otitis media aguda: impacto de la vacunación sistemática neumocócica 13-valente conjugada. Un estudio nacional multicéntrico.
Contacto Investigador Principal	Josefa Ares Alvarez & Fernando Baquero-Artigao Centro de Salud Virxe Peregrina, Pontevedra & Servicio de Pediatría, Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Hospital Universitario La Paz, Madrid Paseo de la Castellana 261 28046 Madrid, Spain +34917277201 finaares@gmail.com fbaqueroartigao@gmail.com

<p>2.1 Objetivos e Hipótesis</p>	<p><u>Objetivos</u></p> <p>1. Objetivo principal El objetivo principal del estudio es evaluar la tasa de portadores nasofaríngeos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en niños sanos y en niños con otitis media aguda (OMA) en España desde los 6 meses hasta los 5 años de vida.</p> <p>2. Objetivos secundarios</p> <p>2.1. Estudiar la distribución de los serotipos de neumococo colonizadores más prevalentes, valorando si se ha producido un reemplazo de los serotipos incluidos en la vacuna conjugada neumocócica 13-valente (PCV13) por serotipos no vacunales.</p> <p>2.2. Analizar la dinámica de la colonización nasofaríngea por neumococo en niños menores de 5 años.</p> <p>2.3. Analizar los serotipos de <i>S. pneumoniae</i> predominantes según la edad del paciente, pertenencia a un medio rural o urbano, asistencia a guardería y administración de antibioterapia reciente.</p> <p>2.4. Valorar si existen diferencias en la frecuencia y distribución de serotipos en nasofaringe de niños sanos y con OMA.</p> <p>2.5. Analizar el perfil de resistencia antibiótica de los neumococos aislados, especialmente a penicilina y macrólidos, comparando los aislamientos de niños sanos con los de los niños con OMA.</p> <p>2.6. Comparar experimentalmente la capacidad de formación de biofilm de los serotipos aislados en niños sanos y con OMA.</p> <p><u>Hipótesis clínica</u></p> <p>1. La implementación de la vacunación universal con la PCV13 en España ha dado lugar a una reducción de la colonización nasofaríngea por serotipos vacunales y a su reemplazo por serotipos no vacunales en niños menores de 5 años.</p> <p>2. El impacto sobre la tasa global de portadores sanos, la edad de inicio y el pico máximo de colonización ha sido bajo. Los factores de riesgo asociados a la colonización asintomática son los mismos que en el periodo prevacunacional.</p> <p>3. El reemplazo de los serotipos vacunales en niños sanos, más resistentes a los antibióticos, por serotipos no vacunales más sensibles ha contribuido a una recuperación de la sensibilidad a betalactámicos y macrólidos en las cepas colonizadoras.</p> <p>4. La colonización por neumococo en niños con OMA es más alta que en niños sanos y los serotipos aislados pueden ser los principales responsables de la otitis neumocócica en la actualidad.</p> <p>5. Los neumococos colonizadores más frecuentes son los que más capacidad tienen para producir biofilm.</p>
<p>2.2 Introducción</p>	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> es una de las bacterias más frecuentes en las infecciones adquiridas en la comunidad, tanto en la población pediátrica como en adultos. Puede causar enfermedad invasiva grave, como sepsis, meningitis y neumonía, además de otros procesos menos graves pero mucho más frecuentes, como otitis y sinusitis. La colonización de la nasofaringe es un paso previo al desarrollo de enfermedad neumocócica (1-3). Las tasas más elevadas de colonización se encuentran en los niños, especialmente en aquellos en edad preescolar, constituyendo el principal reservorio y siendo vectores de transmisión para el resto de la población (1). Un porcentaje variable, que oscila entre el 20% y el 60% de los niños menores de 5 años, está colonizado por neumococo (1-4). Entre</p>

los factores que incrementan la colonización nasofaríngea, se encuentran el hacinamiento, la existencia de muchos hermanos en la familia, la renta baja, el tabaquismo activo o pasivo, la asistencia a guardería y la ausencia de lactancia materna (1, 3, 5). Los aislamientos que se encuentran colonizando la nasofaringe constituyen también el reservorio ecológico principal a partir del cual surgen y se diseminan las resistencias (4), y reflejan los aislados resistentes en la comunidad (6).

El estado de portador nasofaríngeo representa, además, la conexión entre la enfermedad neumocócica del niño y los adultos a través de la transmisión intrafamiliar (7, 8). Los adultos que conviven con niños están colonizados por neumococo con más frecuencia que aquellos que no tienen niños en su domicilio (7, 8).

Antes del advenimiento de las vacunas neumocócicas, la mayoría de las colonizaciones en niños españoles estaban producidas por los serotipos 19, 23, 3, 24 y 11 (9). La introducción de las vacunas antineumocócica conjugadas en el calendario de vacunación sistemática del niño ha supuesto una importante disminución en la colonización (10-13) y en la carga de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en el adulto (14, 15) y el niño (16,17).

La vacuna conjugada heptavalente (PCV7) se comercializó en España en el año 2001 y se incorporó al calendario oficial de vacunación por primera vez en una comunidad autónoma (Madrid) en 2006. En los estudios realizados en España en población pediátrica con elevada tasa de vacunación se observó una reducción en las tasas de colonización por serotipos vacunales, generalmente asociados con resistencias de más alto nivel, compensada por un aumento proporcional en la proporción de serotipos no vacunales (11,12). La tasa de colonización global osciló entre el 30-33% y los serotipos más frecuentemente aislados fueron 19A, 6A, 15 A/B y 11A (11, 12).

La vacuna conjugada 13-valente (PCV13) se comercializó en España en el año 2010 y se ha ido introduciendo en los calendarios vacunales de las distintas comunidades autónomas progresivamente, de forma que desde el año 2018 se realiza una vacunación sistemática universal en pauta 2+1. Numerosos estudios han demostrado la reducción de la colonización nasofaríngea por los serotipos vacunales en los niños vacunados con PCV13 en comparación con PCV7 (18, 19). En España se ha constatado una importante disminución de la ENI con la introducción de la PCV13 (16, 17), aunque en los últimos años ha existido un reemplazo por serotipos no vacunales, especialmente 24F y 8 (17). Tan solo disponemos de un estudio publicado en nuestro medio que haya analizado la colonización nasofaríngea en niños vacunados con PCV13 (13). La tasa global de colonización disminuyó a un 20% y los serotipos más frecuentes fueron los no vacunales: 23A/B, 11A, 10A y 35B/F. Este estudio se realizó únicamente en una comunidad autónoma española (Murcia), y a los 5 años de haber introducido la vacunación sistemática. Es bien conocido que la distribución de serotipos varía a lo largo del tiempo y es diferente de unas áreas geográficas a otras, dependiendo de la presión selectiva de los antibióticos, el tiempo desde la introducción de la vacuna y de otros factores peor conocidos.

La introducción de la PCV13 también ha ocasionado una disminución en la resistencia antibiótica de neumococo en España, tanto en niños como en adultos, sobre todo mediada por el descenso marcado del serotipo 19A (16, 17). Sin embargo, en los últimos años podría estar existiendo un aumento progresivo de resistencias en serotipos no vacunales, especialmente 24F, 23B y 11A (17). En el reciente estudio de colonización nasofaríngea en la región de Murcia, la resistencia

de neumococo a la penicilina fue de un 35.7% (1.5% con alta resistencia $>2\mu\text{g/ml}$), y de un 32.1% a eritromicina. Los serotipos no vacunales más resistentes fueron el 23B, 11A, 35B y 6C.

Para una mejor comprensión de los cambios evolutivos en la epidemiología de la enfermedad neumocócica tras la introducción de PCV13 hemos diseñado un estudio transversal de la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en una amplia población de niños atendidos en centros de salud de toda España. Se trata de un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico coordinado por la Red de Investigación de Pediatría de Atención Primaria PAPenRED, perteneciente a la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria (AEPAP), en colaboración con el Hospital La Paz de Madrid y la Unidad de Neumococos del Centro Nacional de Microbiología.

El estudio va a realizarse en niños sanos y en niños con otitis media aguda (OMA). Es bien conocido que durante los episodios de OMA, hay cambios en la colonización nasofaríngea, con un incremento en la proporción de bacterias patógenas y una disminución de la flora comensal (20). Así, la colonización neumocócica en niños con OMA puede ser alta (21, 22). Se ha postulado que el cultivo nasofaríngeo tomado hasta un mes tras un episodio de OMA se correlaciona bien con la etiología, con porcentajes de concordancia que oscilan entre el 68 y el 97% (23). En el único estudio prospectivo realizado en nuestro país en niños con otitis supurada (24), la colonización nasofaríngea por neumococo fue del 42%. La portación fue más frecuente en niños con otitis neumocócicas confirmadas (58.2%) frente a las ocasionadas por otras bacterias (31%). El mismo serotipo fue identificado en exudado de oído medio y nasofaringe en un 40.5% de los casos. Con porcentajes de vacunación completa frente a PCV13 del 39.3%, los serotipos no vacunales más frecuentes en nasofaringe fueron 11A, 15A, 21 y 24A, y en exudado ótico 21, 11A y 15B. En otro estudio en Barcelona y Guipúzcoa tras la introducción de la PCV13, los serotipos vacunales más frecuentes en niños con OMA supurada fueron 11A y 23B, aunque con diferencias importantes según el área geográfica (25).

Los cambios en la portación nasofaríngea son dinámicos y se ven claramente influidos por la vacunación y por otros factores como la capacidad de producción de biofilm de los serotipos implicados (26, 27). Se ha demostrado que la producción de biofilm varía en los distintos serotipos, dificultaría la activación de la vía del complemento y la fagocitosis (28) y podría ser mayor en niños que en adultos en algunos serotipos emergentes como el 22F y 33F (29), lo que facilitaría la colonización nasofaríngea y su diseminación dentro de la población.

En el futuro dispondremos de dos nuevas vacunas neumocócicas conjugadas que ampliarán la cobertura a 15 y a 20 serotipos. Parece, por tanto, esencial, conocer cómo están evolucionando los serotipos colonizadores en nuestro medio en niños sanos y con OMA para valorar la adecuación de las nuevas vacunas a la evolución de los nuevos serotipos de neumococo.

2.3 Diseño

Estudio transversal, observacional, multicéntrico, de niños entre 6 meses y 5 años, atendidos en centros de salud de atención primaria a nivel nacional, en los que se estudiará durante el periodo de 1 año la colonización por *S. pneumoniae* mediante muestra de frotis nasofaríngeo. El estudio será presentado en el Comité de Ética del Hospital La Paz. Los padres o tutores de los niños recibirán por escrito la información detallada del proyecto y firmarán un consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio

Se diseñará una base de datos anonimizada para este estudio en la que se asignará un código a cada participante y a las muestras obtenidas.

Los datos de los pacientes se mantendrán disgregados de la base de datos en la que solo figurará el código de paciente. Del mismo modo, solo los pediatras conocerán el código asignado a cada paciente. En el caso de obtener un resultado positivo en el estudio de portador, los pediatras informarán a los padres/tutores legales de los niños.

Criterios de inclusión:

Se incluirán dos grupos de niños: **Grupo 1)** niños sanos de 6 meses a 5 años que se reclutarán cuando acudan a controles de promoción de la salud o por patología no infecciosa y **Grupo 2)** niños de 6 meses a 5 años atendidos en los centros participantes con diagnóstico de OMA.

Se definirá OMA cuando se presenten: 1) síntomas compatibles: otalgia, fiebre, irritabilidad o llanto en menores de tres años y 2) signos de otitis en la exploración: abombamiento timpánico, cambios en la coloración de la membrana timpánica (opacidad, coloración amarillenta, exudado purulento en el oído medio), hiperemia intensa (asociado a síntomas), otorrea purulenta, o disminución de la movilidad del tímpano (si se dispone de otoscopia neumática y/o timpanometría).

Criterios de exclusión:

En el grupo 1 de niños sanos se excluirán pacientes que tengan fiebre o síntomas de infección respiratoria aguda en el momento del reclutamiento, que estén tomando antibióticos o los hayan tomado en los últimos 30 días.

Tanto en el grupo 1 como en el grupo 2 serán criterios de exclusión los antecedentes de prematuridad, inmunodepresión, enfermedades crónicas o el tratamiento con inmunosupresores.

Tamaño muestral:

En las edades que el estudio pretende explorar (6 a 60 meses) clásicamente se ha descrito una tasa de colonización por *S. pneumoniae* que varía entre un 30 y un 35%. Publicaciones más recientes que suman a la detección mediante cultivo de muestras nasofaríngeas la determinación mediante reacción en cadena de la polimerasa, encuentran tasas de hasta el 60%. No obstante, estudios poblacionales actuales mediante cultivo, han constatado cierta tendencia a la baja tras la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas hepta y tridecavalentes. En un estudio reciente, en nuestro medio, Alfayate et al (13) detectan una tasa de colonización en niños de uno a cuatro años del 19.7%.

Para un estudio en el que la técnica diagnóstica va a ser el cultivo, se calcula el tamaño muestral en función de ambas posibles prevalencias esperadas de colonización (20% o 40%). En ambos casos y para un nivel de confianza de 0.05 y una precisión de 0,02, con un 15% de pérdidas posibles previstas, incorporadas al cálculo, el tamaño muestral a obtener oscilaría entre 1.808 y 2.712 niños sanos

La prevalencia esperada de neumococo en faringe de niños con OMA, es de un 35%. Para un nivel de confianza de 0.05 con una precisión del 3% y 15% de

pérdidas se considera necesario obtener 1142 casos.

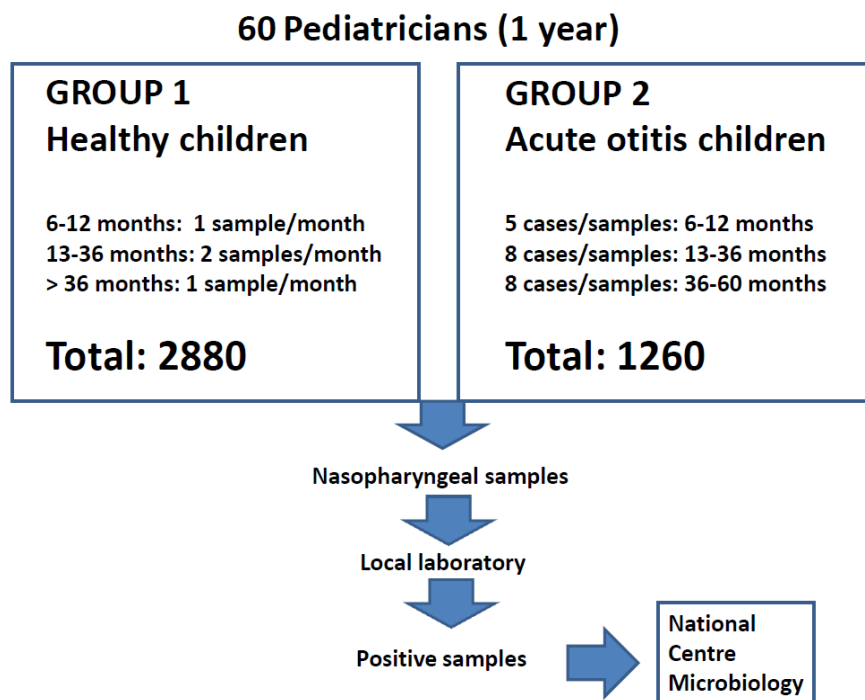
Centros participantes y recogida de muestras:

Para asegurar la diversidad geográfica y la obtención del tamaño muestral máximo calculado, participarán 60 pediatras de atención primaria (PAP) pertenecientes a la red PAPenRED, de todas las regiones de España. Está prevista la participación de 25 hospitales y 60 centros de salud (urbanos 68,3%, rurales 15,1%, mixtos 16,6%), con una distribución de centros rurales y urbanos proporcionales a la población de cada región.

Cada pediatra recogerá 4 muestras mensuales en niños sanos estratificadas por edad, para conseguir una representatividad de todas las edades; 6-12 meses (1 muestra/mes); 13-36 meses (2 muestras/mes); >36 meses (1 muestra/mes). Además se recogerán las correspondientes muestras de niños con OMA (5 de 6-12 meses, 8 de 13 a 36 meses y 8 de 36 a 60 meses). Tras la recogida de cada muestra se completará un cuestionario diseñado al efecto con las variables de estudio que se detallan en los Anexos 1 y 2 (apartado de variables).

Las muestras recogidas en los centros de salud de atención primaria serán enviadas al laboratorio de Microbiología de los Hospitales regionales de referencia donde se realizará el cultivo de las mismas. Los aislados positivos serán almacenados y conservados para su envío al Centro Nacional de Microbiología (Laboratorio Español de Referencia para *S. pneumoniae*) para el tipado de las cepas y estudio de resistencias.

2.5 Gráfico de reclutamiento



2.6 Procedimientos

Recogida de muestras:

Las muestras nasofaríngeas se obtendrán mediante hisopos con punta de algodón. Se accederá a la nasofaringe por vía nasal: el hisopo se pasará suavemente hacia atrás desde una fosa nasal a lo largo del suelo de la cavidad nasal hasta tocar la pared posterior de la nasofaringe. Se girará suavemente el hisopo durante 1 a 2 segundos y se retirará. Las muestras se enviarán en contenedor de transporte de bacterias al laboratorio de microbiología local.

	<p>Estudio microbiológico:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Recogida de muestras clínicas de portadores y niños con AOM. Utilizaremos el protocolo recomendado establecido por el Grupo de Trabajo de Transporte Neumocócico de la OMS como se describió anteriormente (30). Brevemente, las cepas neumocócicas se recogerán del tracto nasofaríngeo utilizando hisopos que se colocarán en viales STGG /desnatados para su transporte y almacenamiento al laboratorio de microbiología donde se procesarán dentro de las 8h en el CNA-Placas de agar sanguíneas de Columbia para aumentar la recuperación de los cocos grampositivos de muestras clínicas y reducir el crecimiento de la microbiota Gram negativa que interfiere. La identificación de <i>S. pneumoniae</i> se llevará a cabo utilizando discos de optoquina y la prueba de solubilidad en desoxicolato. Todos los aislamientos neumocócicos identificados después de 24 horas de incubación se conservarán en frascos de leche descremada a -20°C y se enviarán al Laboratorio Español de Referencia Neumocócica para su posterior caracterización. 2. Caracterización neumocócica. El serotipado se realizará con la reacción de Quellung, el ensayo de punto y/o mediante la metodología de tipificación de secuencias de PCR (31, 32). La susceptibilidad a diferentes antibióticos será determinada por la técnica de dilución de agar y/o por Sensititre de acuerdo con los criterios de EUCAST. 3. Estudio de biofilm. Formación de biofilm y evasión de la respuesta inmune de cepas neumocócicas que crecen como biofilms se investigará utilizando protocolos estándar descritos por uno de los miembros del equipo (28, 29).
<p>2.7 Duración y cronograma</p>	<p>El estudio tendrá una duración total de 2 años. Se considera necesario un período inicial de seis meses para coordinar los equipos y obtener permisos locales. Después de doce meses de reclutamiento, los últimos 6 meses serán utilizados para analizar los resultados y escribir publicaciones.</p> <p><u>Cronograma:</u></p> <p>Octubre de 2021- Primer cuatrimestre de 2022: Trámites administrativos. Primer cuatrimestre de 2022-Primer cuatrimestre de 2023: Reclutamiento. Abril-Septiembre de 2023: Análisis de los datos y publicación de resultados.</p>
<p>2.8 Análisis estadístico y hoja de recogida de datos</p>	<p>El análisis estadístico será realizado en el departamento de estadística del Hospital La Paz. El cálculo del tamaño muestral ha sido previamente descrito.</p> <p>Variables</p> <p><u>Variables principales:</u> portador nasofaríngeo de neumococo (si/no) y serotipos de neumococo.</p> <p><u>Variables secundarias (para todos los pacientes):</u></p> <p><u>Anexo 1. Cuestionario para todos los pacientes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Edad en meses - Sexo (varon/mujer) - Nacionalidad (española o extranjero) - Número de hermanos que conviven en el hogar - Número de orden en la fratría. - Comunidad Autónoma - Residencia: urbana o rural (mayor o menor de 10.000 habitantes respectivamente), - Tipo de residencia: casa o piso.

	<ul style="list-style-type: none"> - Fumador pasivo si o no. - Escolarización si o no (definida como asistencia a guardería o centro escolar de mínimo 2 horas al día al menos tres días a la semana). - Número de personas convivientes en el hogar (excluido el niño y además de los hermanos) - Número de episodios previos de posible infección neumocócica (OMA; neumonía, sinusitis) en el último año. - Número de ingresos hospitalarios (excluidas atenciones en urgencias) en el último año. - Número de ciclos antibióticos recibidos en los últimos 6 meses y antibiótico recibido. - Estado vacunal (completo para su edad si/no). En caso de no ser completo especificar. - Lactancia materna si/no. Meses de lactancia materna. - <p><u>Anexo 2: variables recogidas en caso de OMA</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Edad en meses en el momento del diagnóstico. Fecha de recogida de muestra/diagnóstico - Tiempo transcurrido desde último episodio de OMA: < de 1 mes, 1-3 meses, 3-6 meses, > 6 meses, no ha habido OMA previa - <p>Síntomas OMA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Otagia si/no - Fiebre si/no - Irritabilidad/dolor si/no <p>Signos OMA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Abombamiento timpánico si/no - Hiperemia intensa si/no - Opacidad/nivel si/no - Otorrea purulenta si/no - Diminución de la movilidad del tímpano (si otoscopia neumática y/o timpanometría) si/no <p>Recibió antibioterapia si/no</p> <p>Antibiótico:</p> <p><u>Análisis estadístico</u></p> <p>Para el análisis de resultados se calcularán las medidas de tendencia central y dispersión en función de la normalidad de las distribuciones para variables cuantitativas y los porcentajes con sus correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC 95%) para las cualitativas. Además de la exposición del porcentaje (IC 95%) del global de población pediátrica colonizada, se calculará la distribución porcentual por serotipos. Como aproximación a la implicación de determinados factores de riesgo sobre el estado de portador, se calcularán mediante análisis multivariante las Odds Ratio (con sus intervalos de confianza al 95%) sobre la probabilidad de colonización. Se plantea un modelo de regresión logística para dicho análisis. Como umbral de significación estadística se toma como referencia un valor de “p” por debajo de 0.05.</p> <p>Se analizará independientemente los serotipos encontrados entre niños sanos y niños con OMA.</p>
2.9 Bibliografía	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. Lancet Infect. Dis. 2004; 4: 144–54. 2. Kaur R, Casey JR, Pichichero ME. Emerging Streptococcus pneumoniae strains

colonizing the nasopharynx in children after 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in comparison to the 7-valent era, 2006–2015. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35: 901–6.

3. Lynch JP III, Zhanell GG. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2010; 16: 217–25.
4. Yildirim I, Shea KM, Pelton SI. Pneumococcal disease in the era of pneumococcal conjugate vaccine. *Infect Dis Clin N Am.* 2015; 29: 679-97.
5. Løvlie A, Vestrheim DF, Aaberge IS, Steens A. Changes in pneumococcal carriage prevalence and factors associated with carriage in Norwegian children, four years after introduction of PCV13. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20: 29.
6. Lencastre H, Tomasz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centers and drug resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemoter.* 2002; 50 S2: 75–81.
7. Spijkerman J, van Gils EJM, Veenhoven RH, Hak E, Yzerman EPF, van der Ende A, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011;17: 584–91.
8. Leino T, Auranen K, Jokinen J, Leinonen M, Tervonen P, Tacala AK. Pneumococcal carriage in children during their first two years: importance role of family exposure. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20: 1022-7.
9. López B, Cima MD, Vazquez F, Fenoll A, Gutiérrez J, Fidalgo C, et al. Epidemiological study of *Streptococcus pneumoniae* carriers in healthy primary-school children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18: 771–6.
10. Obando I, Sánchez-Tatay D, Molinos-Quintana A, Delgado-Pecellina I, Porras A, Morillo-Gutiérrez B, et al. Epidemiología de la colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 6 años de la ciudad de Sevilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:581–6.
11. García Vera C, Ruiz Andrés MA, Arana Navarro T, Moneo Hernández I, Castillo Laita JA, Macipe Costa RM, et al. Serotipos de neumococo en nasofaringe de niños preescolares sanos tras la vacunación antineumocócica conjugada heptavalente. *Med Clin (Barc).* 2011;137:1–7.
12. Alfayate-Miguel S, Ruiz-Gomez J, Fenoll-Comes A, Sanchez-Solis-De QM, Iofrio-De AA, Casquet-Barcelo A, et al. Estudio epidemiológico de portadores nasofaríngeos de *Streptococcus pneumoniae* en niños en la comunidad autónoma de Murcia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:434-40
13. Alfayate-Miguélez S, Yague G, Menasalvas AI, Sanchez-Solís M, Domenech M, González F, et al. Murcian Pneumococcal Study Group. Impact of Pneumococcal Vaccination in the Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Healthy Children of the Murcia Region in Spain. *Vaccines (Basel).* 2020 Dec 28;9(1):14.
14. Ciruela P, Broner S, Izquierdo C, Pallarés R, Muñoz-Almagro C, Hernández S, et al. Indirect effects of paediatric conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in older adults. *Intern J Infect Dis.* 2019;86:122–30.
15. Càmara J, Marimón JM, Cercenado E, Larrosa N, Quesada MD, Fontanals D, et al. Decrease of invasive pneumococcal disease (IPD) in adults after introduction of pneumococcal 13-valent conjugate vaccine in Spain. *PLoS One.* 2017;12:e0175224.
16. Picazo JJ, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Negreira S, Baquero-Artigao F, Hernández-Sampelayo T, et al. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in children under 15 years old in Madrid, Spain, 2007 to 2016: The HERACLES clinical surveillance study. *Vaccine.* 2019;37:2200-7.
17. de Miguel S, Domenech M, González-Camacho F, Sempere J, Vicioso D, Sanz, JC, et al. Nationwide Trends of Invasive Pneumococcal Disease in Spain from 2009 Through 2019 in Children and Adults During the Pneumococcal Conjugate Vaccine Era. *Clin. Infect. Dis.* 2020. Sep 29;ciaa1483.
18. Loughlin AN, Hsu K, Silverio AL, Marchan CD, Pelton SI. Direct and indirect

effects of PCV13 on nasopharyngeal carriage of PCV13 unique pneumococcal serotypes in Massachusetts' children. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33: 504-10.

19. Cohen R, Varon E, Doit C, Schlemmer C, Romain O, Thollot F, Béchet S, Bonacorsi S, Levy C. A 13-year survey of pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 and PCV13 implementation. *Vaccine.* 2015 Sep 22;33(39):5118-26.

20. Faden H, Stanievich J, Brodsky L, Bernstein J, Ogra PL. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *Pediatr Infect Dis J.* 1990; 9: 623-6.

21. Revai K, McCormick DP, Patel J, Grady JJ, Saeed K, Chonmaitree T. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media. *Pediatrics.* 2006; 117: 1823-9.

22. Martin JM, Hoberman A, Shaikh N, Shope T, Onika Bhatnagar S, Block SL, et al. Changes Over Time in Nasopharyngeal Colonization in Children Under 2 Years of Age at the Time of Diagnosis of Acute Otitis Media (1999-2014). *Open Forum Infect Dis.* 2018; 5:ofy036.

23. van Dongen TM, van der Heijden GJ, van Zon A, Bogaert D, Sanders EA, Schilder AG. Evaluation of concordance between the microorganisms detected in the nasopharynx and middle ear of children with otitis media. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32: 549-52.

24. Cilveti R, Olmo M, Pérez-Jove J, Picazo JJ, Arimany JL, Mora E, Pérez-Porcuna TM, Aguilar I, Alonso A, Molina F, Del Amo M, Mendez C; HERMES Study Group. Epidemiology of Otitis Media with Spontaneous Perforation of the Tympanic Membrane in Young Children and Association with Bacterial Nasopharyngeal Carriage, Recurrences and Pneumococcal Vaccination in Catalonia, Spain-The Prospective HERMES Study. *PLoS One.* 2017 Feb 1;12(2):e0170316.

25. Morales M, Ludwig G, Ercibengoa M, Esteva C, Sanchez-Encinales V, Alonso M, Muñoz-Almagro C, Marimón JM. Changes in the serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing otitis media after PCV13 introduction in Spain. *PLoS One.* 2018 Dec 18;13(12):e0209048.

26. Weimer KE, Armbruster CE, Juneau RA, Hong W, Pang B, Swords WE. Coinfection with *Haemophilus influenzae* promotes pneumococcal biofilm formation during experimental otitis media and impedes the progression of pneumococcal disease. *J Infect Dis* 2010; 202: 1068–75.

27. Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Bakaletz L, Givon-Lavi N. Mixed pneumococcal-nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media is a distinct clinical entity with unique epidemiologic characteristics and pneumococcal serotype distribution. *J Infect Dis* 2013; 208: 1152–60.

28. Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2013; 81: 2606-15.

29. Sempere J, de Miguel S, González-Camacho F, Yuste J, Domenech M. Clinical Relevance and Molecular Pathogenesis of the Emerging Serotypes 22F and 33F of *Streptococcus pneumoniae* in Spain. *Front Microbiol.* 2020; 11: 309.

30. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian PV, Antonio M, Hare KM, Henao-Restrepo AM, Leach AJ, Klugman KP, Porter BD, Sá-Leão R, Scott JA, Nohynek H, O'Brien KL; WHO Pneumococcal Carriage Working Group. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine.* 2013; 32:165-79.

31. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:764-6.

32. Elberse KE, van de Pol I, Witteveen S, van der Heide HG, Schot CS, van Dijk A, van der Ende A, Schouls LM. Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands in the pre-vaccination era assessed by MLVA and capsular sequence typing. *PLoS One.* 2011;6(5):e20390.

