

Serotipificación de aislados de enfermedad invasiva en menores de cinco años por PCR multiplex secuencial en Paraguay

Serotyping of invasive disease isolates in children under five year old by sequential multiplex PCR in Paraguay

León María., Kawabata Aníbal. Chamorro Gustavo.

Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social
Asunción-Paraguay

Recibido: 02/11/2016

Aceptado: 05/12/16

Resumen: Mediante la implementación de una PCR multiplex secuencial con protocolo CDC para Latinoamérica se serotipificó cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de enfermedad invasiva en niños menores de cinco años en Paraguay, durante el período 2011 a 2013. Se identificaron 58.6 % de los serotipos en la primera reacción de PCR, 19.1% en la segunda reacción, 8.3% en la tercera reacción, 3.8% en la cuarta reacción, 0.6% en la quinta reacción, 3.8% en la sexta reacción, 1.3% en la séptima y octava reacción amente. El 100% de las cepas aisladas (N=157) fue confirmada por Quellung. El serotipo 14 fue encontrado con mayor prevalencia en 33.1 % de las enfermedades invasivas, seguido del serotipo 3 y 6A con 8.3% ; serotipo 19F con 7%, serotipo 6B con 5.7% y 4.5% con serotipo 7F. Puesto que la introducción de la vacuna neumocócica conjugada (PCV10) en Paraguay se produjo en el año 2012, se evidencia una disminución de aislamientos de los serotipos vacunales como el serotipo 1, 5, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Así mismo se pudo observar un aumento de los serotipos 3 y 9A, así como la aparición de otros serotipos no vistos hasta entonces como los serotipos 9N, 23B, 24F y 38. Ello puede estar indicando un cambio post vacunal en la frecuencia de serotipos.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, PCR multiplex secuencial, Serotipificación, Vacuna neumocócica conjugada 10-valente, enfermedad invasiva.

Abstract: Through the implementation of a sequential multiplex PCR with CDC protocol for Latin America, strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive disease in children under five in Paraguay during the period 2011 to 2013 were serotyped. 58.6% of serotypes were identified in the first PCR reaction, 19.1% in the second, 8.3% in the third, 3.8% in the fourth, 0.6% in the fifth, 3.8% in the sixth, 1.3 % In the seventh and eighth reaction. Total isolates (N = 157) were confirmed by Quellung. Serotype 14 was found with higher prevalence in 33.1% of invasive disease, followed by serotype 3 and 6A with 8.3%; serotype 19F with 7%, with 5.7% serotype 6B and 4.5% with serotype 7F. Since the introduction of pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) in Paraguay occurred in 2012, a decrease of isolates of vaccine serotypes is evident as serotypes 1,5, 9V,14, 18C, 19F and 23F. Likewise, an increase in serotypes 3 and 9A could be observed, as well as the appearance of other serotypes not previously seen such as serotypes 9N, 23B, 24F and 38. This may indicate a post vaccine change in the frequency of serotypes.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, multiplex sequential PCR, Serotyping, 10-valent pneumococcal conjugate vaccine, invasive disease

1. Introducción

Las enfermedades por neumococo siguen siendo un problema de salud pública en todo el mundo, son la primera causa de muerte por enfermedades inmunoprevenibles en niños menores de 5 años y causan alrededor de un millón de muertes anuales en la infancia, lo que representa la mitad de la mortalidad en todas las edades, según estimaciones de la OMS [1]. En países en vías de desarrollo, un alto porcentaje (60%-90%) de los casos de neumonía por *S. pneumoniae* producen la muerte y entre el 40 y el 75% de los casos de meningitis generan muerte o discapacidad [2].

En Paraguay, las infecciones de vías respiratorias continúan siendo una de las 10 primeras causas de morbilidad y mortalidad en los menores de cinco años de edad [3]. De acuerdo con datos del sistema de información en salud, vigilancia de la salud y los resultados del Laboratorio Central de Salud Pública, se estima que en el país se presentan alrededor de 790 casos de neumonía grave y 161 casos de meningitis por neumococo por año. La frecuencia registrada en Paraguay indica que el 35.8% de los casos se presentan entre los 3 y 8 meses, y durante los primeros dos años de vida se han registrado el 75.4% de los casos de infección invasiva. Después de los 2 años de edad, las infecciones invasivas por neumococo son relativamente raras [4]. Los serotipos de *S. pneumoniae* más frecuentes en meningitis y neumonías en menores de cinco años en Paraguay son el 14 y el 5, que suman alrededor de la mitad de los casos del 2000 al 2010. La distribución cíclica de los serotipos se ha modificado, por ejemplo, en el periodo del 2000 al 2007, el serotipo 1 fue muy frecuente, en los últimos dos años el serotipo 5 no ha sido aislado en el país, el 14 muestra una tendencia ligeramente descendente. En el periodo 2006 al 2010 se aprecia una reducción en la frecuencia de aislamientos de los serotipos 6B, 5 y 9V, y un incremento proporcional de los serotipos 1, 14 y 6B [5].

Streptococcus pneumoniae es la causa principal de infecciones adquiridas en la comunidad [6,7]. Es el agente causal más frecuente en la etiología de las infecciones respiratorias y enfermedad sistémica invasiva con cuadros graves y a veces fatales como la bacteriemia sin foco aparente de infección, la neumonía complicada y la meningitis [8,9]. Forma parte de la flora bacteriana normal de la mucosa nasofaríngea. La colonización es más elevada en niños y adultos mayores de 60 años de edad [10], causando una mayor incidencia de la enfermedad neumocócica en estas franjas etarias [11]. La transmisión del germen ocurre por contacto estrecho de un individuo a otro. El proceso de colonización y el desarrollo de la enfermedad dependen de múltiples factores que implican al microorganismo y el huésped [12]. Según estudios hasta un 65% de la población general es portadora nasofaríngea de esta bacteria [13].

La virulencia está determinada por el polisacárido capsular, que proporciona protección frente a la fagocitosis e inhibe la actividad del complemento. La inmunización va dirigida

principalmente contra la capsula. Las cepas de *S. pneumoniae* son capaces de producir más de 90 polisacáridos capsulares de diferente estructura química [14,15]. Cepas no capsuladas son raras pero estuvieron implicadas en brotes de conjuntivitis en militares y estudiantes [16]. Tan solo 16 serotipos causan aproximadamente el 90% de las enfermedades invasivas en todo el mundo [17], el serotipo 14 y serotipos 6, 23 y 19 son los tipos más frecuentes aislado de los niños con infecciones graves [18].

La vacuna antineumocócica conjugada produce una respuesta de anticuerpos circulantes protectores y genera memoria inmunológica. Esta estrategia protege contra la infección invasora y de mucosas causadas por los serotipos incluidos en la vacuna. Existen estudios que describen eficacia superior al 90% con una duración de 3 años, aunque hay señales que indican que la protección puede ser más prolongada [19].

El esquema de vacunación, en Paraguay, que emplea la vacuna neumocócica conjugada 10-Valente (PCV10) incluye los antígenos polisacáridos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F del *S. pneumoniae*. Ocho serotipos están conjugados a la proteína transportadora D derivada del *Haemophilus influenzae* no tipificable, mientras los serotipos 18C y 19F, a las proteínas acarreadoras de toxoide tetánico y diftérico, respectivamente. Esta vacuna comenzó a aplicarse en el año 2012 en población de dos a once meses de edad con dos dosis de vacuna de neumococo conjugada y población de 12 a 23 meses de edad con una dosis de vacuna de neumococo [20].

El Laboratorio Central de Salud Pública, como laboratorio de referencia nacional, es el único que realiza serotipificación neumocócica usando la reacción de Quellung [21], que es el estándar de oro para la serotipificación, esta es una técnica costosa que requiere un panel de más de 90 antisueros específicos y el envío de cepas que no pueden ser serotipadas a laboratorios de referencia sub regional. El objetivo de este estudio fue implementar una PCR multiplex secuencial para la determinación de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados en Paraguay, debido a que la misma es una técnica muy sensible, de costo moderado que identifica rápidamente los serotipos prevalentes en la región.

2. Materiales y métodos

Población

Se estudiaron 157 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas por métodos microbiológicos convencionales, de enfermedades invasivas (meningitis, neumonías y sepsis) en niños menores de cinco años remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública, conteniendo datos epidemiológicos y de sensibilidad a los antimicrobianos (según criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute), durante el periodo 2011-2013.

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas e identificadas por medio de la prueba de optoquina y solubilidad en bilis. Se realizó la extracción con el método BEC [22] suspendiendo un asa de siembra de cultivo de 24 horas de una placa de agar sangre de carnero al 5%, en 300uL de solución salina al 0,85%. La suspensión se calentó a 70°C durante 15 min, seguido se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se adicionó 50uL de TE 1X, 12 uL mutanolisina y 8uL de hyaluronidasa. Se vortexó, se incubó a 37°C durante 30 minutos, se calentó a 100°C por 10 minutos. Se centrifugó y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C.

PCR secuencial multiplex

La PCR está diseñada para detectar un total de 40 serotipos mediante el uso de ocho reacciones secuenciales [23], en este caso se usó el set para Latinoamérica [24], que está dividida en ocho reacciones de cinco serotipos cada una más un control positivo interno de una región conservada de 160 pares de base (pb) del operón cps del *S. pneumoniae*. Se utilizaron como controles positivos, cepas de *S. pneumoniae* de colección de aislados clínicos de neumococos que representan diferentes serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9N, 10A, 11D, 12F, 13, 14, 15A, 16F, 17F, 18B, 19A, 19F, 20, 23A, 23B, 24F, 33F, 35B, 38.

Las PCR se realizaron mediante el uso de secuencias de cebadores publicados anteriormente [24]. Se añadió una alícuota de 2,5 ul de ADN extraído de 22,5 ul de mezcla maestra conteniendo tampón buffer 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM de KCl, 0,1 mM EDTA, 1 M de ditiotreitól, 0,5% de Tween 20, 0,5% Nonidet P-40; Promega Inc., Madison, Wis.), 200mM de cada trifosfato de desoxinucleósido (New England Biolabs, Beverly, MA), 2,5 mM de MgCl₂, 2,0 U de TaqADN polimerasa (Promega Inc.), y los cebadores con concentraciones establecidas en protocolo CDC [23]. El termociclado se realizó en el sistema labcycler (SENSOQUEST) con las siguientes condiciones: 94 ° C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de amplificación de 94 ° C durante 45 s, 54°C durante 45 s, y 65 ° C durante 2 min 30 s.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en PowerPac Basic (BIO RAD) en tampón TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 100 V durante 90 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 UG/ul) y se registraron en imágenes con GelDoc (BIO RAD). Los tamaños de los productos de PCR se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular (escala de 50 pb; Novagen, Inc.).

Todos los serotipos que resultaron de las PCR fueron confirmados por la reacción de Quellung [21].

Técnica de recolección de datos

La fuente de información primaria utilizada fueron las fichas de notificación utilizadas dentro del marco de la vigilancia de las neumonías y meningitis bacterianas, los cuales contienen datos epidemiológicos de los pacientes, como edad, sexo, diagnóstico, tipo de

muestra (LCR, sangre o líquido pleural), fecha de toma de muestra y fecha de remisión de muestras.

Procesamiento y análisis de los datos

Para el procesamiento de la información se confeccionó una planilla, donde se expresó toda la información obtenida en las fichas y se incorporó a una base de datos. Los resultados se analizaron y discutieron mediante la presentación de cuadros estadísticos, expresados en números absolutos y en porcentajes.

Técnicas de Análisis de Datos

Las variables cuantitativas fueron descriptas a través de medidas de tendencia central y dispersión. Las variables cualitativas fueron descriptas a través de frecuencias absolutas, y porcentajes, los resultados arrojados se expresaron en gráficos y cuadros porcentuales para mejor comprensión de los mismos.

Los programas utilizados fueron la planilla Excel para la confección de la base de datos, epi Info 6.0 [25] y Stata.11 [26] para el análisis estadístico.

3. Resultados

Se aislaron por métodos microbiológicos convencionales, un total de 157 cepas de *Streptococcus pneumoniae* de niños menores de cinco años con enfermedad invasiva, entre enero de 2011 a diciembre de 2013. El 43.3% (N=68) fue aislado en el año 2011, 31.2% (N=49) en el año 2012 y 25.5% (N=40) en el año 2013. En los tres años de estudio, la enfermedad invasiva con mayor frecuencia fue la neumonía bacteriana aguda (NBA) con 75% (N=117) de los casos, seguida de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) con 10% (N=10), meningitis bacteriana aguda (MBA) con 9% (N=14) y sepsis en 6% de los casos (N=10). **Cuadro 1.**

Cuadro 1. Distribución de *Streptococcus pneumoniae* según enfermedad invasiva por año. Paraguay. 2011 a 2013

Año	MBA	NBA	NAC	Sepsis	Total
2011	10	39	13	6	68
2012	2	42	1	4	49
2013	2	36	2	0	40
Total	14	117	16	10	157

El grupo de edad más afectado fue el de 0 a 11 meses de edad con 34.4% (N=54), seguido del grupo de 12 a 23 meses con 24.2%(N=38), siendo prevalente en el sexo masculino con 56.6% de los casos. **Cuadro 2.**

Cuadro 2. Frecuencia de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según edad y sexo. Paraguay. 2011 a 2013

Edad (meses)	Masculino	Femenino	N	%
0 -11	34	20	54	34.4
12 - 23	22	16	38	24.2
24 - 35	17	15	32	20.3
36 - 47	3	9	12	7.7
48 - 59	13	8	21	13.4
Total	89	68	157	100

Para este estudio se implementó una PCR multiplex secuencial con protocolo CDC para Latinoamérica. Se identificaron 58.6 % de los serotipos en la primera reacción de PCR, 19.1% en la segunda reacción, 8.3% en la tercera reacción, 3.8% en la cuarta reacción, 0.6% en la quinta reacción, 3.8% en la sexta reacción, 1.3% en la séptima reacción y octava reacción respectivamente. Fueron confirmadas por Quellung el 100% de las cepas aisladas (N=157). **Cuadro 3.**

Cuadro 3. Resultados de PCR multiplex secuencial de serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. Paraguay. 2011 a 2013

Serotipos incluidos en la PCR multiplex secuencial por reacción	Producto de PCR esperado (bp)	Productos amplificados	Confirmación por Quellung	Aislamientos % (N=157)
PCR 1				58.6% (N=92)
6A/6B/6C/6D	250	22	6A (13), 6B (9)	
9V/9A	816	6	9V (3), 9A (3)	
14	189	52	14 (52)	
19 ^a	566	6	19A (6)	
23F	384	6	23F (6)	
PCR 2				19.1% (N=30)
3	371	13	3 (13)	
15B/15C	496	1	15B (1)	

17F	693	1	17F (1)	
18A/18B/18C/18F	573	4	18C (4)	
19F	304	11	19F (11)	
PCR 3				8.3% (N=13)
1	280	2	1 (2)	
5	362	2	5 (2)	
7F/7A	599	7	7F (7)	
9N/9L	516	1	9N (1)	
16F	717	1	16F (1)	
PCR 4				3.8% (N=6)
2	290	0	0	
4	430	2	4 (2)	
8	201	0	NA	
20	514	1	20 (1)	
22F/22A	643	3	22F(2), 22A(1)	
PCR 5				0.6% (N=1)
7C/7B/40	260	0	0	
10 ^a	628	0	0	
11A/11D	463	0	0	
12F/12A/44/46	376	1	12F (1)	
23 ^a	722	0	0	
PCR 6				3.8% (N=6)
13	655	2	13 (2)	
15A/15F	434	3	15A (2), 15F (1)	
21	192	0	0	
33F/33A/37	338	1	33F (1)	
35F/47	517	0	0	
PCR 7				1.3% (N=2)
23B	119	1	23B (1)	
35A/35C/42	280	0	0	
35B	677	0	0	

38/25F/25A	574	1	38 (1)
39	98	0	0
PCR 8			1.3% (N=2)
10F/10C/33C	248	0	0
19Fvar	585	0	0
24F/24A/24B/48	99	2	24F (2)
31	701	0	0
34	408	0	0

No tipificables con cpsA positivo 3.2% (N=%)

El serotipo 14 fue encontrado con mayor prevalencia en 33.1 % de las enfermedades invasivas (52/157), seguidos de los serotipos 3 y 6A con 8.3% (13/157) respectivamente, serotipo 19F con 7% (11/157), serotipo 6B con 5.7% (9/157) y serotipo 7F con 4.5% (7/157). El 62.4% (N= 98) de los serotipos identificados corresponden a serotipos vacunales (PCV 10) y 37.6% (N=59) a serotipos no incluidos dentro de la vacuna PCV 10 . Se puede observar una disminución de los aislamientos del serotipo 14 a lo largo de estos tres años de estudio así como del serotipo 19F, 23F. Los serotipos 1 y 5 no fueron aislados en el año 2013. Además se evidencia un aumento en el serotipo 3 y 6B. **Cuadro 4.**

Cuadro 4. Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. Paraguay. 2011 a 2013

Serotipo	2011	2012	2013	N	%	VACUNA
1	2	0	0	2	1.3	P C V 10
4	1	0	1	2	1.3	
5	1	1	0	2	1.3	
6B	2	3	4	9	5.7	
7F	1	3	3	7	4.5	
9V	1	2	0	3	2	
14	30	12	10	52	33.1	
18C	3	0	1	4	2.5	NO VACU NAL
19F	5	5	1	11	7	
23F	5	1	0	6	3.8	
3	3	5	5	13	8.3	
6A	5	4	4	13	8.3	
19A	1	3	2	6	3.8	
9A	0	1	2	3	2	
9N	0	0	1	1	0.6	
12F	1	0	0	1	0.6	
13	2	0	0	2	1.3	
15A	1	1	0	2	1.3	
15B	1	0	0	1	0.6	
15F	0	1	0	1	0.6	
16F	1	0	0	1	0.6	
17F	0	1	0	1	0.6	
20	1	0	0	1	0.6	
22	1	1	1	3	2	
23B	0	0	1	1	0.6	
24	0	1	1	2	1.3	
33	0	1	0	1	0.6	
38	0	0	1	1	0.6	
NT	0	3	2	5	3.2	
TOTAL	68	49	40	157	100	

Conclusiones

El 62.4% de los serotipos (N= 97) corresponden a serotipos vacunales incluidos en la vacuna conjugada (PCV 10) y 37.6% (N=59) a serotipos no incluidos dentro de la vacuna PCV 10. El serotipo 14 tiene un predominio significativo así como en otros países del Cono Sur como Brasil, Chile, Uruguay y Colombia [27] y por lo general está relacionado con un clon originado en España/Francia.

Se evidencia una disminución de aislamientos de los serotipos vacunales como el serotipo 1, 5, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, así como también se puede observar un aumento de los serotipos 3 y 9A, y la aparición de otros serotipos no encontrados hasta entonces como los serotipos 9N, 23B, 24F y 38, luego de la introducción de la vacuna conjugada 10-valente al país, lo que puede estar indicando un cambio post vacunal en la frecuencia de serotipos. Por ahora no se ha observado un incremento de ST 19A, no contenido en la vacuna PCV10, como ocurrió en otros países. Esto es relevante dado que 19A se asocia a alta resistencia antimicrobiana y gravedad clínica [28].

Discusión

Los resultados de la PCR indican que se determinaron un poco más de la mitad de todos los serotipos en la primera reacción de PCR y que sumada con la segunda reacción equivalen a más de las tres cuartas partes de la serotipificación, esto puede llegar a reducir los costos de esta técnica, debido al elevado costo de los antiserosos específicos en comparación con los costos de una PCR.

Es de vital importancia determinar de forma precisa los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* para el desarrollo de nuevas vacunas [29] que está basado actualmente en datos de prevalencia de serotipos proporcionados por la red de laboratorios de vigilancia centinela. Para ello se debe mantener una vigilancia permanente del comportamiento de los serotipos, ya que existe la posibilidad de sustitución de serotipos vacunales por los no vacunales [30,31].

Fortalezas y limitaciones del estudio

Este estudio pretende conocer el comportamiento de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* implementando en el laboratorio una técnica de PCR, que será utilizada en la rutina del laboratorio de microbiología complementando la reacción de Quellung.

Una limitación al realizar la evaluación retrospectiva de las fichas epidemiológicas reveló omisión de información clínica y algunos datos de identificación incompletos.

Agradecimientos

A María da Gloria Carvalho, PhD., por el entrenamiento envolviendo PCR multiplex convencional y en tiempo real para serotipificación de *S. pneumoniae*, en Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch. Division of Bacterial Diseases. National Center for Immunization and Respiratory. Atlanta, EEUU. Al Prof. Dr. Fernando Lozano por la revisión del anteproyecto de investigación y del artículo científico. Al Dr. Facetti Masulli por su orientación en la realización del protocolo de investigación. Al Dr. Mario Martínez, Jefe del Dpto. Bacteriología y Micología por su apoyo en la realización del proyecto. A los colaboradores de la red de Vigilancia de Meningitis y Neumonías (VIMENE) en las personas de: Dra. Gloria Gómez, Hospital Nacional de Itauguá, Dra. Noemí Zárate, Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñu, Dra. Juana Ortellado, Hospital de Clínicas San Lorenzo, Dra. Mirian Leguizamón, Instituto de Previsión Social, Dra. Raquel Blasco, Hospital Regional Ciudad del Este, Dr. Juan Irala, Instituto de Medicina Tropical, Dra. Rosana Ortiz, Bacteriología Asistencial (LCSP), Dr. Gustavo Rodríguez, Hospital de Trauma y Dra. Rossana Franco, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente (INERAM).

La realización de este trabajo fue apoyado por subvenciones de FOCM-Mercosur (COF 03/11).

Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. WHO position paper. Weekly Epidemiological Record. 2007; 82: 93-104.
2. World Health Organization. Pneumococcal vaccine. Wkly Epidemiol Report 2003; 14:110-9.
3. MSPBS/OPS. Perfil de salud de la niñez de Paraguay. Paraguay, 2011. Subsistema de Información de las Estadísticas Vitales. Dirección de Bioestadística. Asunción. 2009; p28
4. Sanabria, G et al. Correlation of serotypes, antimicrobial sensitivity and resistance in children with invasive infections by *Streptococcus pneumoniae* in a reference center of Asunción-Paraguay. Review 6 years. Rev. Inst. Med. Trop. 2009; 4(2): 14-24.
5. Chamorro G et al. *Streptococcus pneumoniae* isolated in children under six years old in Paraguay from 2000 to 2008: Serotypes prevalence and beta-lactam antibiotic resistance. Rev. Par. Epidemiol. 2011, 2(1) Junio. 2011: 11-17.
6. Plouffe JS, Moore R, Davis R, et al. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* blood culture isolates from adults in Franklin County, Ohio. J Clin Microbiol 1994; 32:1606-1607.
7. Ruiz-Gonzalez A, Falguera M, Nogues A, et al. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. Am J Med 1999; 106 (4) abril :385-390.
8. Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C, et al. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. Pediatr Infect Dis J 1998 Nov; 17(11):986-91.
9. Johnston, Jr, R. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Rev Infect Dis 1991; 13 (Suppl 6): S509-S517.

10. Phillips EJ, Simor AE. Bacterial meningitis in children and adults: changes in community-acquired disease may affect patient care. *Postgrad Med* 1998; 103:102–17.
11. Gray, BM, Converse IIIGM, and DillonHC. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J. Infect. Dis.* 1979;140:979–983.
12. Caputo GM, Appelbaum PC, Liu HH. Infections due to penicillin-resistant pneumococci. Clinical, epidemiologic and microbiologic features. *Arch Intern Med.* 1993;153(11):1301-10.
13. Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 632-9.
14. Kamerling, J P. Pneumococcal polysaccharides: A chemical view. In *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease, A. Tomasz, Editor. Mary Ann Liebert, Inc. Larchmont, NY. 2000.;p. 81–114.
15. Bentley SD, Aanensen DM., Mavroidi A., Saunders D, Rabinowitsch E., *et al.* Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. 2006; *PLoS Genet* 2: e31.
16. Crum NF, Barrozo CP, Chapman FA, Ryan MA, Russell KL. An outbreak of conjunctivitis due to a novel unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* among military trainees. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1148-1154.
17. Feldman, C & Klugman, KP. Pneumococcal infections. *Curr Opin Infect Dis* 1997;10:109-115.
18. Austrian R. Pneumococcal infections. En: Last JM, Wallace RB. Public health and preventive medicine. Norwalk Connecticut: Appleton Century Crofts; 1992: 8789.
19. Vigilancia de las neumonías y meningitis bacterianas en menores de 5 años. Guía Práctica. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC. 2009.
20. Resolución S.G. N° 38 del 24.01.2012. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.
21. Austrian, R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt. Sinai. J. Med.* 43, 699-709. 1976.
22. Pai, R., R. E. Gertz, and B. Beall. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44:124–131
23. Dias, C. A., L. M. Teixeira, M. da G. Carvalho, and B. Beall. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* 2007. 56:1185–1188.
24. Da Gloria Carvalho *et al.*, Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. Protocol for Multiplex PCR - *S. pneumoniae* SEROTYPING - clinical specimens-Latin America set *J Clin Microbiol.* 2010 May; 48(5): 1611 8. doi: 10.1128/JCM.02243-09. Epub 2010 Mar 10.
25. CDC/WHO. Epi Info 6.04d. [Fecha de acceso: 1 noviembre de 2003]. URL disponible en: <http://www.cdc.gov/epiinfo> [[Links](#)]
26. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 8.0. College Station, TX: Stat Corporation; 2002. [[Links](#)]
27. Ruvinsky R., Gentile A., Regueira M, Corso A., Pace J., Bakir J. *et al.* Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: Estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia *Rev. chil. pediatr.* v.75 n.1 Santiago 2004, ene. 75 (1): 77-79. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062004000100013>

28. Ricketson LJ, Vanderkooi OG, Wood ML, Leal J, Kellner JD. Clinical features and outcomes of serotype 19A invasive pneumococcal disease in Calgary, Alberta. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2014;25 (2):e71-e75.
29. Hausdorff, W. P., J. Bryant, P. R. Paradiso, and G. R. Siber. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin. Infect. Dis.* 2000. 30:100–121.
30. Lipsitch, M. Interpreting results from trials of pneumococcal conjugate vaccines: a statistical test for detecting vaccine-induced increases in carriage of nonvaccine serotypes. *Am. J. Epidemiol.* 2001. 154: 85–92.
30. Veenhoven, R., D. Bogaert, C. Uiterwaal, C. Brouwer, H. Kiekebrink, J. Bruin, E. Ijzerman, P. Hermans, R. de Groot, B. Zegers, W. Kuis, G. Rijkers, A. Schilder, and E. Sanders. Effect of conjugate pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent otitis media: a randomized study. *Lancet* 2003. 361: 2189–2195.