

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de colonización nasofaríngea por neumococo en niños de 1 a 5 años de edad institucionalizados en Cienfuegos. 2014-2015

Prevalence of naso-pharyngeal Pneumococcal colonization in children between 1 to 5 years old in pre-school educative centers. 2014-2015

Dunia María Chavez Amaro¹ María Felicia Casanova González² María Eugenia Toledo Romaní³ Nivaldo Linares Pérez³ Gilda Toraño Peraza³ Martha Montes de Oca Rivero²

¹ Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos, Cienfuegos, Cuba

² Hospital Pediátrico Universitario Paquito González Cueto, Cienfuegos, Cuba

³ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba

Cómo citar este artículo:

Chavez-Amaro D, Casanova-González M, Toledo-Romaní M, Linares-Pérez N, Toraño-Peraza G, Montes-de-Oca-Rivero M. Prevalencia de colonización nasofaríngea por neumococo en niños de 1 a 5 años de edad institucionalizados en Cienfuegos. 2014-2015. **Medisur** [revista en Internet]. 2018 [citado 2020 Abr 1]; 16(3):[aprox. 6 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3779>

Resumen

Fundamento: El *Streptococcus pneumoniae* forma parte de la flora bacteriana normal de la mucosa nasal y faríngea. La colonización nasofaríngea antecede a la enfermedad neumocócica y los individuos afectados constituyen el reservorio a nivel comunitario.

Objetivo: determinar la prevalencia de colonización nasofaríngea global y por serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños de 1 a 5 años institucionalizados, previo a la vacunación antineumocócica.

Métodos: se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el municipio de Cienfuegos, en el período comprendido de junio del 2014 hasta abril del 2015, en niños de edades entre 1 y 5 años, que asisten a círculos infantiles (N=1 129). Las muestras de exudado nasofaríngeo se tomaron siguiendo los protocolos establecidos. Se estimó la prevalencia de colonización y se identificaron los serotipos más frecuentes.

Resultados: la prevalencia global de colonización nasofaríngea por neumococos fue de 32,32 %. Los serotipos vacunales más frecuentes fueron el 19F (6,02 %) y el 6B (3,99 %); de los relacionados con la vacuna, predominó el 6A (5,49 %) y de los no vacunales, el más observado fue el 14B.

Conclusión: la colonización nasofaríngea en niños preescolares no vacunados contra el neumococo presentó una prevalencia elevada, a expensas de los serotipos incluidos en las vacunas conjugadas antineumocócicas.

Palabras clave: Streptococcus pneumoniae, enfermedades nasofaríngeas, vacunas conjugadas

Abstract

Foundation: *Streptococcus pneumoniae* is part of the normal bacterial flora of the nasal and pharyngeal mucosa. Naso-pharyngeal colonization precedes the pneumococcal disease and affected individuals are a reservoir at the community level.

Objective: to determine the prevalence of global naso-pharyngeal colonization and by serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in children of pre-school age before anti pneumococcal vaccination.

Methods: a cross descriptive study in the Cienfuegos Municipality, within the period of June 2014 and April 2015. in children aged between 1 and 5 years attending preschool educative centers (N=1 129). Samples of naso-pharyngeal exudates were taken following the set guidelines. The prevalence of colonization was estimated and the most frequent serotypes were identified.

Results: the global prevalence of naso-pharyngeal colonization was 32,32 %. The most frequent vaccine serotypes were 19F (6,02 %) and 6B (3,99 %); of those related with the vaccine, 6A predominated (5,49 %) and of the not related to the vaccine the most frequently observed was 14B.

Conclusion: naso-pharyngeal colonization in preschool children not vaccinated against pneumococcus presented a high prevalence at the expense of the serotypes included in the conjugated anti-pneumococcal vaccines.

Key words: Streptococcus pneumoniae, nasopharyngeal diseases, vaccines, conjugate

Aprobado: 2018-06-11 11:22:42

Correspondencia: Dunia María Chavez Amaro. Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos metmed5807@ucm.cfg.sld.cu

INTRODUCCIÓN

El *Streptococcus pneumoniae* o neumococo (*S. pneumoniae*) es reconocido como el principal patógeno bacteriano que afecta el tracto respiratorio de niños y adultos. Ocasiona infecciones de la vía aérea superior, y constituye la principal causa de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en los países desarrollados y en vías de desarrollo.¹

La enfermedad neumocócica constituye una de las diez primeras causas de muerte en los países desarrollados. Se estima que del 15 al 30 % de todas las neumonías son debidas al neumococo.² Se transmite por vía respiratoria, especialmente por núcleo-gotitas de aproximadamente 10µm que permanecen en suspensión. Su cápsula de polisacáridos le permite evadir la fagocitosis, facilitando la invasividad del germen, que puede también ocasionar meningitis, septicemia, fiebre sin foco y, más raramente, artritis, peritonitis y celulitis.³ El costo de la enfermedad neumocócica es una carga económica importante y significativa para los sistemas de salud y las familias.⁵

La colonización nasofaríngea es un tema importante en la epidemiología de las infecciones neumocócicas, ya que es el paso previo a la enfermedad y condiciona la selección de resistencias. Todas las enfermedades causadas por neumococos están precedidas de una colonización nasofaríngea asintomática de mayor o menor duración, en función de diferentes factores, pero principalmente de la invasividad de cada serotipo. El porcentaje de portadores asintomáticos varía con la edad, el entorno y la presencia de infecciones en el tracto respiratorio alto. La prevalencia de portadores puede llegar a alcanzar hasta el 60 % en los niños en edad preescolar, 35 % en los de edad escolar y hasta un 29 % en adultos jóvenes.⁶

En la actualidad, se describen 97 serotipos de neumococos inmunológicamente distintos, que varían según la estructura de su cápsula de polisacáridos. Cada serotipo difiere en sus propiedades biológicas, la capacidad patógena e invasora, los síndromes que producen, la capacidad para colonizar la nasofaringe y la resistencia a antibióticos.⁷

La introducción de la vacuna conjugada antineumocócica (PCVs) en los esquemas de inmunización, es una herramienta efectiva para la prevención y control de la enfermedad

neumocócica y la colonización nasofaríngea. La nueva generación de vacunas conjugadas antineumocócicas es altamente efectiva en niños menores de dos años y se ha introducido en varios países con gran éxito, con registros de una disminución evidente en la incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en menores de cinco años.⁸⁻¹²

Cuba no ha iniciado la vacunación antineumocócica, pero un candidato vacunal heptavalente (PCV7-TT) se encuentra actualmente en fase de evaluación clínica, y se espera poder introducirlo para el año 2019.¹³⁻¹⁵

Se realiza este estudio con el objetivo de determinar la prevalencia de colonización nasofaríngea en niños institucionalizados de 1 a 5 años de edad, del municipio de Cienfuegos durante el período 2014-2015. Este constituye parte de las evidencias de línea de base, previas a la introducción de la nueva vacuna conjugada antineumocócica cubana.

MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional transversal en el municipio de Cienfuegos, en el período de junio de 2014 a abril de 2015.

De los 4 084 niños matriculados en los 26 círculos infantiles ubicados en las ocho áreas de salud del municipio, fueron incluidos 1 129, teniendo en cuenta los siguientes criterios: edad, consentimiento informado firmado por los padres o tutores, asistencia a la institución y tratamiento antibiótico siete días antes de que se recogieron muestras clínicas, o historia previa de vacunación contra neumococo.

Los exudados nasofaríngeos (ENF) fueron recogidos por el técnico de laboratorio del área de salud, previamente entrenado, utilizando hisopos flexibles de nylon estéril flocados (Copan, Italia). Se siguió el procedimiento establecido de insertar el hisopo en la parte posterior de la nasofaringe y girar antes de ser retirado. Este se colocó directamente en un tubo que contenía 1,0 ml del medio de cultivo leche descremada triptona-glucosa-glicerol (LTGG). Las muestras fueron transportadas al laboratorio de microbiología del Hospital Pediátrico de Cienfuegos en hielo seco, se agitaron durante 10 segundos, se congelaron y conservaron a -70 °C.

El aislamiento de *S. pneumoniae* y la serotipificación fueron realizadas en el

Laboratorio Nacional de Referencia de Neumococo del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (LNRN-IPK). La identificación de *S. pneumoniae* se basó en la presencia de α -hemólisis y la inhibición por optoquina.¹⁶ Las muestras de ENF se descongelaron a temperatura ambiente (25 °C), se agitaron, y utilizando el hisopo contenido en el tubo, se inocularon en placas de agar sangre con 5 % de sangre de carnero y 5 mg/L de gentamicina. Estas se incubaron durante 18-24 h a 37 °C en atmósfera de CO₂.

De los cultivos sugerentes de neumococo, en función de la presencia de α -hemólisis, se seleccionaron al menos dos colonias. Estas se cultivaron en placas de agar sangre en las que se incluyó un disco de optoquina. Los aislamientos susceptibles a optoquina se informaron como *S. pneumoniae*, y ante resultados dudosos se corroboró mediante la prueba de la solubilidad en bilis. Cada cultivo recuperado de una misma muestra de ENF identificado como neumococo, se conservó independientemente. Los aislamientos confirmados como *S. pneumoniae* se almacenaron a -70 °C en 1,0 mL del medio LTGG hasta el momento de la serotipificación.

El tipo capsular o serotipo se determinó empleando la reacción de Neufeld-Quellung o reacción de hinchamiento capsular, utilizando el juego de reactivos Pneumotest (*Statens Serum Institute*, Copenhage, Dinamarca).¹⁶

Los serotipos se clasificaron en: a) serotipos vacunales incluidos en el candidato vacunal cubano contra neumococo (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F); b) relacionados con la vacuna por posible reacción cruzada (6A y 19A); c) serotipos no vacunales, o sea, no incluidos en la formulación de dicho candidato vacunal; y d) "sin serotipar", aislamientos para los que no se podría asignar una cápsula.

Se estimó la prevalencia de la colonización NF global y por serotipos. Se describieron las proporciones de serotipos vacunales, los relacionados con la vacuna y los serotipos no vacunales.

La variable dependiente fue la colonización nasofaríngea (resultado positivo/ resultado negativo) y las independientes: edad (de 12 a 23 meses/2 a 5 años), serotipos aislados (vacunales, relacionados con la vacuna, no vacunales, no serotipados). El análisis estadístico se realizó utilizando el software R, a través del cual se estimaron las diferencias de significación estadística mediante la prueba de chi cuadrado con un nivel de significación de 0,05.

Se realizó una entrevista individual utilizando un cuestionario semiestructurado diseñado al efecto, donde se recogieron los datos de identificación del sujeto y de la muestra de exudado nasofaríngeo, los cuales se incluyeron en una base de datos utilizando *Microsoft Access* versión 2007.

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del IPK y de la Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos, así como por el Consejo Científico Provincial.

RESULTADOS

De los ENF analizados, 365 estaban colonizados, lo que representó el 32,32 %. (Tabla 1).

Tabla 1. Colonización nasofaríngea global por neumococo en niños entre uno y cinco años institucionalizados en círculos infantiles

Colonización nasofaríngea	No.	%
Positivos	365	32,32
Negativos	764	67,68
Total	1 129	100,00

Predominaron los serotipos vacunales, con 15,6 % del total de ENF, resultado significativamente estadístico. El grupo etario de 2 a 5 años mostró mayor colonización a expensas de los serotipos vacunales. (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de serotipos de neumococo en relación con grupos etarios en niños de uno a cinco años institucionalizados

Serotipos	1 a 5 años n=1 129			12 a 23 meses n=560			2 a 5 años n=569			p
	No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	
Global	365	32,3	29,7-35,2	137	24,5	21,1-28,2	228	40,1	36,1-44,1	<0,001
Vacunales	176	15,6	13,6-17,8	67	12	9,5-14,9	109	19,1	16,1-22,6	0,001
Relacionados con la vacuna (6A, 19A)	91	8,1	6,6-9,8	39	7	5,1-9,4	52	9,1	7,0-11,8	0,218
No vacunales	64	5,7	4,5-7,2	25	4,5	3,0-6,5	39	6,8	5,0-9,2	0,108
No serotipados	34	3,0	2,2-4,2	6	1,1	0,5-2,3	28	4,9	3,4-7,0	<0,001

Los serotipos vacunales más frecuentes fueron el 19F (6,02 %) y el 6B (3,99 %). De los serotipos relacionados con la vacuna, el 6A fue el más frecuente con un 5,49 %. (Tabla 3).

Tabla 3. Colonización nasofaríngea según serotipos vacunales y grupos etarios en niños de 1 a 5 años institucionalizados

Serotipos	Grupos etarios				Total		p	
	12 a 23 meses n= 560		2 a 5 años n=569		n=1 129			
	No.	%	No.	%	No.	%		
Vacunales PCV7-T	14	10	1,79	15	2,63	25	2,21	0,3416
	18C	0	0	4	0,70	4	0,35	0,1244
	6B	14	2,50	31	5,45	45	3,99	0,01733
	19F	31	5,54	37	6,50	68	6,02	0,5771
Relacionados con la vacuna	23F	12	2,14	22	3,87	34	3,01	0,1285
	6A	31	5,54	31	5,45	62	5,49	1
	19A	8	1,43	21	3,69	29	2,57	0,0182

De los serotipos no vacunales, el de mayor frecuencia de aislamiento fue el 15B, encontrado en 14 muestras (21,87 %), seguido por los serotipos 19C y 23A en 10 muestras (15,64 %) cada uno, y los serotipos 29, 34, 35, 42, 47 en 7 muestras (10,94 %). (Tabla 4).

Tabla 4. Colonización nasofaríngea por serotipos no vacunales en niños institucionalizados

Serotipos no vacunales	No.	%
10A	1	1,56
10B	1	1,56
10C	1	1,56
11A	3	4,69
15B	14	21,87
15C	2	3,12
15F	1	1,56
18A	3	4,69
18B	3	4,69
18F	2	3,12
19B	1	1,56
19C	10	15,64
23A	10	15,64
23B	2	3,12
23F	1	1,56
29,34,35,42,47	7	10,94
9N	1	1,56
9V	1	1,56
Total	64	100,00

DISCUSIÓN

La ENI se considera un problema de salud pública en el mundo, que afecta tanto a niños como adultos, con un amplio espectro de manifestaciones de la enfermedad.¹⁷

Los resultados del presente artículo forman parte de los estudios previos a la introducción de la vacuna cubana antineumocócica PVC7-TT, y contribuyen a evaluar la efectividad y el impacto de esta en los niños menores de cinco años.

La colonización nasofaríngea por neumococo en la muestra estudiada se comporta de forma similar a lo registrado en la literatura.^{18,19} Se ha estimado que entre un 25 y 60 % de los niños menores de 4 años están afectados por esta bacteria.²⁰ Estudios realizados en Europa plantean que del 25-60 % de los niños y un 6-29 % de los jóvenes, presentan colonización nasofaríngea por este germen, relacionada en el caso de los adultos, a la convivencia con lactantes y párvulos.^{21,22}

La mayor proporción de serotipos aislados en esta población, correspondió a serotipos vacunales (19F, 6B, 23F, 14 y 18C); de manera

que puede estimarse que al introducir la vacuna cubana en el esquema de inmunización, se debe reducir en un 40 % la carga de colonización nasofaríngea, influyendo favorablemente en la morbimortalidad de la enfermedad neumocócica.

La distribución de serotipos varía a lo largo del tiempo, así como para las diferentes zonas geográficas, dependiendo de la edad, del uso de antibióticos y de otros factores conocidos.²³ En poblaciones no vacunadas contra neumococo, los serotipos que con más frecuencia colonizan la nasofaringe son el 3, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, comportamiento muy similar al encontrado en este estudio, teniendo en cuenta tanto los serotipos vacunales como los relacionados con la vacuna.

Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que los serotipos predominantes en el mundo son 4, 14, 6, 19, 23, 18 y 9, y que los más prevalentes en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y Europa, son 6, 14, 19 y 23.^{12,24}

Varios artículos científicos²⁵⁻²⁷ avalan que, aunque la nasofaringe de los niños es colonizada en el primer año de vida y la vacunación en los primeros meses resulta muy efectiva, también es una realidad que la efectividad de la vacunación antineumocócica en niños entre 1 y 5 años como población meta, reducirá la transmisibilidad del neumococo y la carga de enfermedad, produciéndose efecto rebaño en el lactante y convivientes adultos.

En Cuba existen pocos estudios sobre los serotipos causantes de ENI, aunque ha sido documentado que los serotipos 14, 19A, 19F, 6B, 23F y 6A fueron detectados con frecuencia en niños menores de 5 años de edad hospitalizados.²⁸ Los serotipos 1, 5, 6A, 6B, 14, 19F y 23F, constituyen causa frecuente de enfermedad neumocócica en menores de 5 años en todo el mundo.²⁹

Se concluye que la colonización nasofaríngea por neumococo es elevada en los niños preescolares a expensas de serotipos vacunales, lo que resulta una contribución a la generación de la nueva evidencia científica previa a la introducción de la vacuna antineumocócica en el esquema nacional de inmunización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis*. 2005 ; 5 (2): 83-93.
2. Sinclair A, Xie X, Teltscher M, Dendukuri N. Systematic review and meta-analysis of a urine-based pneumococcal antigen test for diagnosis of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2013 ; 51 (7): 2303-10.
3. Muhammad RD, Oza-Frank R, Zell E, Link-Gelles R, Narayan KM, 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.
4. De la Hoz F, Gálvis N, Narváez J, Orozco J. Evaluación del impacto epidemiológico y económico de la introducción de la vacuna del neumococo en Colombia. *Infectio*. 2008 ; 12 (15): 90.
5. Bello T, Rivera IA, Sisco MC, Spadola E, Hermans PW, de Waard JH. PCR deduction of invasive and colonizing pneumococcal serotypes from Venezuela: a critical appraisal. *J Infect Dev Ctries*. 2014 ; 8 (4): 469-73.
6. Salleras L, Domínguez A, Izquierdo C. Epidemiología de la enfermedad neumocócica en el adulto. In: Moraga Llop FA. La enfermedad neumocócica y su prevención. Caminando hacia el futuro. Madrid: F.A. Moraga Llop; 2010. p. 113-26.
7. Lee H, Cha JH, Nahm MH, Burton RL, Kim KH. The 7-valent pneumococcal conjugate vaccine elicits cross-functional opsonophagocytic killing responses to *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D in children. *BMC Infect Dis*. 2013 ; 13: 474.
8. Diamantino J, Aguiar I, Carrico JA, Melo J, Ramirez M. Clonal and serotype dynamics of serogroup 6 isolates causing invasive pneumococcal disease in Portugal: 1999-2012. *PLoS One*. 2017 ; 12 (2): e0170354.
9. Lee GM, Kleinman K, Pelton SI, Hanage W, Huang SS, Lakoma M, et al. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on *Streptococcus pneumoniae* carriage in young children in Massachusetts. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014 ; 3 (1): 23-32.
10. Ben-Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N, Schlesinger Y, Somekh E, Aviner S, et al. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: an active prospective nationwide surveillance. *Vaccine*. 2014 ; 32 (27): 3452-9.
11. Moore CE, Paul J, Foster D, Mahar SA, Griffiths D, Knox K, et al. Reduction of invasive pneumococcal disease 3 years after the introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the Oxfordshire region of England. *J Infect Dis*. 2014 ; 210 (7): 1001-11.
12. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis*. 2015 ; 15 (3): 301-9.
13. González N, Paredes B, Pérez S, Mirabal M, Rivero I, González C, et al. Safety and immunogenicity of Cuban antipneumococcal conjugate vaccine PCV7-TT in healthy adults. *MEDICC Rev*. 2015 ; 17 (4): 32-7.
14. Dotres CP, Puga R, Ricardo Y, Brono CR, Paredes B, Echemendía V, et al. Safety and preliminary immunogenicity of Cuban pneumococcal conjugate vaccine candidate in healthy children: A randomized phase I clinical trial. *Vaccine*. 2014 ; 32 (41): 5266-70.
15. Toledo ME, Casanova MF, Linares N, García D, Toraño G, Barcos I, et al. Prevalence of Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage among Children 2-18 Months of Age: Baseline Study Pre Introduction of Pneumococcal Vaccination in Cuba. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 ; 36 (1): e22-e28.
16. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* [Internet]. Geneva: WHO; 2011. [cited 12 Jun 2017] Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/full-manual.pdf>.
17. Oliveira LH. La vigilancia de la enfermedad neumocócica en América Latina y Caribe: conceptos, oportunidades y desafíos [Internet].

- São Paulo: OPS; 2013. [cited 12 Jun 2017] Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=20982&Itemid=3.
18. Croucher NJ, Kagedan L, Thompson CM, Parkhill J, Bentley SD, Finkelstein JA, et al. Selective and genetic constraints on pneumococcal serotype switching. *PLoS Genet.* 2015 ; 11 (3): e1005095.
19. Ziane H, Manageiro V, Ferreira E, Moura IB, Bektache S, Tazir M, et al. Serotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive pneumococcal disease and asymptomatic carriage in a pre-vaccination period, in Algeria. *Front Microbiol.* 2016 ; 7: 803.
20. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J4, Rudan I5, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet.* 2015 ; 385 (9966): 430-40.
21. Tin M, Christopoulou D, Schmitt HJ. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis.* 2015 ; 15: 419.
22. Van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Imöhl M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. *PLoS One.* 2015 ; 10 (7): e0131494.
23. Muñoz C, Ciruela P, Esteva C, Marco F, Navarro M, Bartolomé R, et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect.* 2011 ; 63 (2): 151-62.
24. Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. High prevalence of genotype 6E (putative serotype 6E) among noninvasive/colonization isolates of *Streptococcus pneumoniae* in northern Japan. *Microb Drug Resist.* 2015 ; 21 (2): 209-14.
25. Knol MJ, Wagenvoort GH, Sanders EA, Elberse K, Vlaminckx BJ, de Melker HE, et al. Invasive pneumococcal disease 3 years after introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2015 ; 21 (11): 2040-44.
26. Desai A, Sharma D, Crispell EK, Baughman W, Thomas S, Tunali A, et al. Decline in Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage of Vaccine Serotypes after the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children in Atlanta, Georgia. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 ; 34 (11): 1168-74.
27. Principi, N, Terranova L, Zampiero A, Manzoni F, Senatore L, Rios WP, et al. Oropharyngeal and nasopharyngeal sampling for the detection of adolescent *Streptococcus pneumoniae* carriers. *J Med Microbiol.* 2014 ; 63 (Pt 3): 393-8.
28. Toraño G, Pérez L, Abreus M, Rodríguez M, Dickinson F, Valcarcel M, et al. Serotipos y resistencia antimicrobiana de aislamientos meníngeos de *Streptococcus pneumoniae*, Cuba, 2007-2012. *Vacci Monitor [revista en Internet].* 2014 [cited 12 Jun 2017] ; 23 (3): [aprox. 12p]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v23n3/vac06314.pdf>.
29. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* 2007 ; 196 (9): 1346-54.