

Vigilancia microbiológica de infecciones por bacterias capsuladas y su inmunoprevención

Dres. María Hortal¹, José Luis Di Fabio²

Resumen

Muchas de las enfermedades prevalentes de la infancia han sido controladas con vacunas, y otras se encuentran en vías de lograrlo. El laboratorio de bacteriología tiene un papel fundamental en la caracterización fenotípica y genotípica de las bacterias, contribuyendo con una vigilancia microbiológica antes y después de la aplicación de una vacuna. Por ese motivo, se revisó la información generada en el Departamento de Laboratorios de Salud Pública en relación a Haemophilus influenzae b, Neisseria meningitidis B y C, y Streptococcus pneumoniae. Aunque H. influenzae b es el patógeno dominante dentro de la especie, igualmente se realizaron estudios para su caracterización. La identificación y frecuencia de los aislamientos de N. meningitidis B y C resultaron fundamentales para decidir intervenciones con vacunas. La serotipificación de los S. pneumoniae aislados de niños con neumococcias invasoras permitió determinar las potenciales coberturas que proporcionarían las fórmulas de las vacunas conjugadas, y también otras con antígenos proteicos. Los datos consignados confirman la necesidad de mantener la vigilancia microbiológica de las infecciones controladas con vacunas.

Palabras clave: Vigilancia sanitaria.
Infecciones por Haemophilus - prevención y control.
Infecciones por Neisseriaceae - prevención y control.
Infecciones neumocócicas - prevención y control.
Inmunoterapia.

1. Ex Prof. Agregado, Depto. Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina. Prof. (de primer nivel) Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de la República.

Coordinador Nacional Programa OPS/SIREVA, e investigador principal del proyecto sobre Carga de Enfermedad de las Neumonías y Meningitis del Niño.

2. Asesor en investigación, producción y control de calidad de vacunas. Programa especial de vacunas e inmunizaciones. OPS, Washington, DC, EEUU.

Correspondencia: Dra. María Hortal. Hidalgo 532, Montevideo-Uruguay 11.300. E-mail: mhortal@st.com.uy

Recibido: 1/6/01.

Aceptado: 28/9/01.

Muchas de las enfermedades infecciosas prevalentes de la infancia han sido controladas mediante vacunas y otras se encuentran en vías de prevenirse en un futuro próximo.

En la actualidad la vigilancia de las infecciones inmunoprevenibles desborda el ámbito nacional, por lo que se participa en programas multinacionales, realizando estudios de base previos a la intervención de vacunación y su seguimiento posterior para monitorear el impacto de las vacunas (poliomielitis, sarampión, hepatitis B, etcétera). Revisaremos la contribución de los laboratorios de patología clínica y del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) del Ministerio de Salud Pública (MSP) a la vigilancia, proporcionando además la información generada sobre las características epidemiológicas locales que son fundamentales a la hora de decidir una intervención.

Aunque el papel desempeñado por los laboratorios es generalizable a todas las vacunas, nos referiremos, en particular, a la información previa y posterior a la inmunoprevención de infecciones por bacterias capsuladas tales como *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*.

El éxito logrado en los países desarrollados con las vacunas conjugadas anti-*H. influenzae* b rápidamente trascendió fronteras. En Uruguay, en los años 1992-1993, las meningitis por esta etiología habían aumentado, acompañadas de mortalidad o de lamentables secuelas, creando así, por parte del cuerpo médico y del público en general, presiones para que se incorporara la vacuna conjugada al programa nacional de vacunación, lo que se concretó en agosto de 1994. La reducción de los casos de meningitis y de neumonías bacteriémicas fue notoria^(1,2) y, presumiblemente, también la frecuencia de la colonización orofaríngea en los niños, principales responsables de la diseminación del agente.

Al igual que en el resto del mundo, el *H. influenzae* tipo b tenía en Uruguay una participación casi exclusiva en las enfermedades severas como meningitis y neumonías, en tanto que los *H. influenzae* capsulados no b (a, c-f) y las cepas no tipificables siguen teniendo un impacto muy limitado en estas enfermedades. Sin embargo, los *H. influenzae* no tipificables tienen una importante participación en la otitis media aguda del niño.

A pesar de que no fue necesario basarse en datos microbiológicos para decidir por la vacunación anti-Hib en el país, en el DLSP existían datos históricos de la vigilancia de *H. influenzae*, así como una colección de cepas pre y posvacunación perfectamente caracterizadas. En las etapas previas a la vacunación se habían estudiado características fenotípicas de los *H. influenzae* tipo b aislados en el país (serotipos, biotipos, subtipos de membrana externa, epítomos en lipopolisáridos, susceptibilidad a antimicrobianos) y genotípicas (tipos electroforéticos enzimáticos)⁽³⁻⁵⁾. También se había demostrado que la mayoría de los aislamientos de oído medio en casos de otitis agudas correspondían a *H. influenzae* no tipificables y, por lo tanto, no serían prevenibles por la vacuna, que está dirigida específicamente al serotipo b⁽⁶⁾.

Desde fines de 1994, cuando se implementó la vacunación, hasta la fecha, sólo se registraron dos o tres casos de meningitis por *H. influenzae* tipo b al año (sólo un niño con vacunación completa) y ocasionalmente se identifica alguna neumonía bacteriémica por esa etiología. La aparición de esos casos esporádicos indica la persistente circulación entre la población susceptible del *H. influenzae* tipo b, a pesar de que la vacunación debía lograr también la disminución de la colonización orofaríngea. Recientemente, en Chile y en Alaska, se demostró que entre niños vacunados que concurren a guarderías o viven hacinados,

los porcentajes de portación del agente eran mayores de lo esperado^(7,8). Surgió así en Uruguay la inquietud por verificar lo que estaba sucediendo con la colonización orofaríngea de la población infantil luego de seis años de iniciada la vacunación y en ocasión del cambio (1998) de la vacuna conjugada monovalente anti-*H. influenzae* tipo b por una vacuna pentavalente que incluye, además de Hib, tétanos, difteria, coqueluche y hepatitis B.

Resultados preliminares de una investigación realizada en Montevideo por el laboratorio de bacteriología del DLSP, en población abierta de niños de 6 meses a 5 años de edad (n=213) detectó la existencia de solo tres portadores de *H. influenzae* tipo b en el grupo de niños de 4 a 5 años de edad. El porcentaje verificado (1,4%) cae dentro de los niveles admisibles de portación (datos no publicados). Si bien se ha llegado a un control casi total de la enfermedad, esto no equivale a la erradicación del agente, por lo que es crucial mantener los niveles de cobertura logrados. Los países de América reconocieron rápidamente la importancia para la salud pública de esta vacuna y, a la fecha, más de 90% de los niños en el continente cuentan con el beneficio de tenerla incorporada en su esquema de vacunación. El impacto logrado por la vacuna en Uruguay, y posteriormente en Chile, ha servido de ejemplo para la región y para el mundo⁽⁹⁾.

La prevención de las meningitis causadas por *N. meningitidis* plantea una problemática más compleja que en el caso anterior. De los 13 serogrupos capsulares reconocidos, unos pocos se asocian a enfermedades sistémicas o invasión del sistema nervioso central (A, B, C, Y y W-135). La distribución geográfica y el predominio de los serogrupos A, B, C, Y es variable. En el mundo ocurren epidemias por *N. meningitidis* A y C, en tanto que el serogrupo B mantiene una endemia, con casos esporádicos o brotes epidémicos en áreas limitadas. No obstante, en el año 2000 se produjo un brote internacional de enfermedad meningocócica por W135, vinculado a una festividad en Arabia Saudita⁽¹⁰⁾.

En Uruguay, el monitoreo de la enfermedad meningocócica⁽¹¹⁻¹³⁾ demostró que entre 1987 y 1994 predominaron los casos producidos por *N. meningitidis* B con porcentajes que oscilaron anualmente entre 63% y 96% del total. A partir de 1993, comenzó a registrarse un predominio relativo del serogrupo C, llegando a representar 73% de los casos. Durante ese período también ocurrieron brotes causados por cepas del serogrupo C en Rivera, primero, y más tarde en Paysandú^(14,15). Técnicas moleculares demostraron que los aislamientos correspondientes a ambos departamentos estaban genéticamente emparentados con cepas aisladas en los países limítrofes⁽¹⁶⁾.

Ante el aumento de los casos de enfermedad meningocócica debidos al serogrupo C, en 1996 se vacunó a niños mayores de 2 años y adultos menores de 20 años

con una vacuna polisacáridica A-C^(17,18), registrándose un relativo descenso en el número de casos por el serogrupo C, tal como ocurrió en 1976 (figuras 1 y 2). Hoy día la vigilancia indica que persisten en el país meningitis por *N. meningitidis* de los grupos B y C.

Actualmente, la vigilancia se completa con la tipificación y subtipificación con anticuerpos monoclonales por inmunoensayo de los aislamientos de los grupos B y C. Mientras que las vacunas A y C con base en los polisacáridos capsulares inducen anticuerpos bactericidas, el polisacárido capsular del serogrupo B, al tener una estructura química similar a ciertos antígenos fetales, no es inmunogénico. Esto ha dificultado el desarrollo de una vacuna antimeningococo B. Sin embargo, personas convalecientes de infecciones por *N. meningitidis* B producen anticuerpos bactericidas contra proteínas de la pared celular y los lipooligosacáridos. Basados en esta comprobación, se han diseñado vacunas alternativas, incorporándoles las proteínas de la membrana externa de la bacteria. Estas

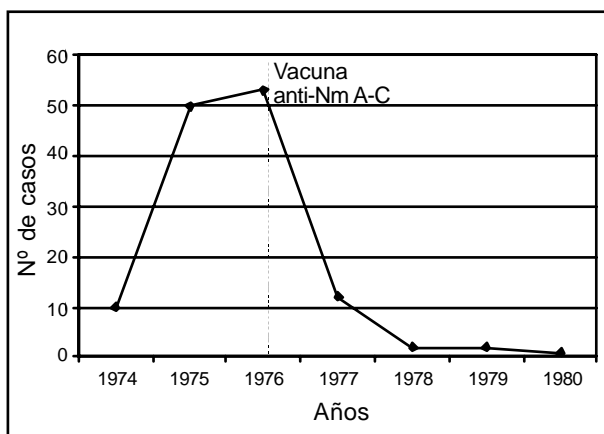


Figura 1. Casos de meningitis por *Neisseria meningitidis* en adultos e impacto de la vacunación⁽¹⁷⁾. (anti-Nm A-C: anti-*Neisseria meningitidis* A-C).

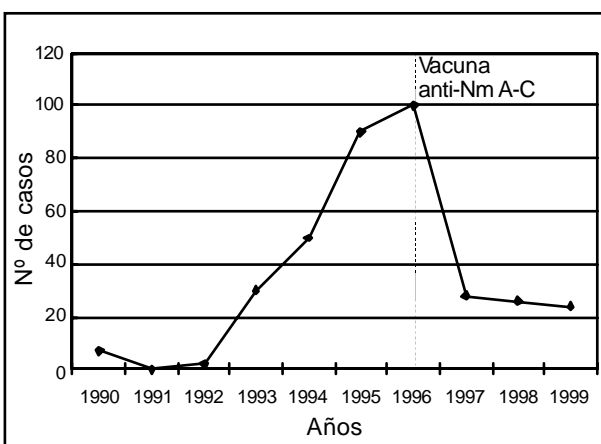


Figura 2. Denuncias de casos de meningitis por *Neisseria meningitidis* e impacto de la vacunación⁽¹⁸⁾. (anti-Nm A-C: anti-*Neisseria meningitidis* A-C).

vacunas, aunque seguras^(19,20), mostraron inmunogenicidad variable en diferentes ensayos de campo y su respuesta es pobre en niños pequeños. La eficacia de estas vacunas depende, además, de la identidad de los subtipos responsables de la enfermedad con los incluidos en las vacunas.

Las vacunas polisacáridicas disponibles no se incluyen en los planes rutinarios de vacunación, pues no ofrecen protección a largo plazo ni proporcionan una efectiva cobertura a un importante grupo de riesgo que son los niños menores de 2 años de edad. En consecuencia, teniendo en cuenta el éxito de la vacuna conjugada anti-Hib, los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* han sido tratados químicamente adicionándoles proteínas transportadoras (CRM₁₉₇, mutante no toxigénica de la toxina diftérica; toxoide tetánico, etcétera). Una vacuna conjugada anti-N m C ha sido aplicada recientemente en Inglaterra, con un éxito notable, en toda la población menor de 18 años (D Salisbury, comunicación personal).

En la vigilancia se incluye también, en forma rutinaria, la determinación de la concentración inhibitoria mínima para la penicilina, ampicilina y rifampicina porque en algunos países se comprobó reducción de la susceptibilidad de los meningococos a esos fármacos. A la fecha, en el país no se detectó resistencia a rifampicina, pero de acuerdo con esos antecedentes mencionados, el monitoreo de su susceptibilidad es fundamental, pues es el antibiótico de elección para la prevención de casos secundarios de meningitis⁽²¹⁾.

S. pneumoniae plantea una problemática totalmente diferente a las precedentes. Sus 90 serotipos capsulares complican mucho su prevención mediante vacunas. La vigilancia microbiológica de este agente infeccioso iniciada en el país en la década del 80, se intensificó a partir de 1994, cuando comenzó un programa multinacional promovido por OPS/SIREVA, del que participaron, además de Uruguay, Argentina, Brasil, Chile, Colombia y México. Su objetivo principal era recabar información sobre los serotipos prevalentes en la región, lo que serviría de base para proponer una vacuna conjugada apta para lograr la inmunización de los niños latinoamericanos menores de 2 años^(22,23).

Desde 1983 se dispone de una vacuna que contiene 23 polisacáridos capsulares purificados correspondientes a los serotipos que más frecuentemente se asocian con enfermedades severas. Esta vacuna, según datos de Uruguay, cubriría 96% de los serotipos invasores aislados de neumococcias del adulto, pero al igual que las otras vacunas polisacáridicas no induce respuesta protectora en menores de 2 años⁽²⁴⁾. Se recomienda su utilización, con revacunación cada cinco años, para individuos mayores de 65 años, y en inmunodeprimidos, esplenectomizados de cualquier edad, pacientes con anemia drepanocítica,

fístula de líquido cefalorraquídeo, y en múltiples enfermedades crónicas (cardiovasculares, pulmonares, hepáticas o renales). No se le ha incluido en programas de vacunación para el adulto y se le subutiliza aun cuando tiene indicaciones muy precisas. Aunque su capacidad inmunogénica está demostrada en individuos inmunocompetentes, su efectividad es naturalmente menor en personas muy añosas o en inmunodeprimidos⁽²⁵⁾.

Se han desarrollado vacunas conjugando proteínas transportadoras a los polisacáridos u oligosacáridos de los serotipos prevalentes en enfermedades sistémicas de niños menores de 2 años (tabla 1). Estas vacunas han mostrado un excelente poder inmunogénico en pruebas de campo^(26,27). En la actualidad, una vacuna conjugada heptavalente (Prevenar, Wyeth/Lederle) conteniendo los antígenos capsulares de los serotipos más frecuentes en Estados Unidos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), ha sido aprobada para su uso en ese país. Esta vacuna, si bien contiene el serotipo 14, que es el que más frecuentemente se asocia con enfermedad invasora en los menores de 5 años de Uruguay, carece de los serotipos 5 y 1, segundo y tercero en frecuencia en el país, lo que limita su cobertura global a 48,2%. Pero, si se analizan diferentes grupos etarios y enfermedades, esas coberturas varían. Así, por ejemplo, la cobertura para las neumonías en niños de 4 a 11 meses de edad alcanza 75%, en tanto que en el grupo de 2 a 4 años es de 38%.

Otras vacunas conjugadas conteniendo 9 y 11 antígenos se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo y pueden elevar la potencial cobertura a 80% y 90% respec-

tivamente⁽²⁸⁾.

Los neumococos tienen su nicho ecológico natural en la orofaringe de los niños, donde cohabitan con otras especies bacterianas. En ese ámbito, el *S. pneumoniae*, que es naturalmente competente para la transformación genética, puede tomar ADN extraño (de otro neumococo o de otra especie), e incorporarlo a su cromosoma por recombinación, cambiando así diversas propiedades, tales como su serotipo o su susceptibilidad a los antibióticos. Presiones inmunológicas como las que ejercería la aplicación masiva de una vacuna podrían fomentar intercambios de genes de cápsula como un mecanismo de evasión, logrando neumococos genéticamente idénticos a los epidémicos, pero expresando serotipos diferentes⁽²⁹⁾.

Debido a la diversidad antigénica de los neumococos, a los posibles intercambios genéticos y al costo de las vacunas conjugadas multivalentes, se están investigando vacunas alternativas, con componentes proteicos de los neumococos (neumolisina, antígenos de la pared, etcétera). Por ejemplo, las PspA de la pared bacteriana ofrecen perspectivas promisorias. Aunque estas proteínas tienen considerable variabilidad, los cruces antigénicos existentes entre las diferentes familias posibilitan una buena cobertura vacunal⁽³⁰⁾. No obstante, un producto con estas características requerirá alrededor de diez años para cumplir todas las etapas necesarias a fin de demostrar, en pruebas de campo, inocuidad, inmunogenicidad y efectividad.

En un futuro cercano, en Uruguay, la posibilidad de emplear vacunas con polisacáridos conjugados aparece

Tabla 1. Vacunas polisacáridicas antineumococo, disponibles y en desarrollo

Fabricante	Polisacáridos	Proteína transportadora	Etapas de desarrollo
Wyeth-Lederle	4,6B,9V,14,18C,19F,23F	CRM197	Registrada en Estados Unidos, febrero 2000
Wyeth-Lederle	1,4,5,6B,9V,14,18C,19F,23F	CRM197	Fase III
Aventis Pasteur	1,3,4,5,6B,7F,9V,14,18C,19F,23F	Toxoide diftérico 3,6B,14,18C Toxoide tetánico 1,4,5,7F,9V,19F,23F	Fase III
SmithKline Beecham (Glaxo SmithKline)	1,3,4,5,6B,7F,9V,14,18C,19F,23F	OMP <i>H. influenzae</i> no tipificable	Fase III
Merck Research Lab	4,6B,9V,14,18C,19F,23F	OMP <i>N. meningitidis</i> serogrupo B	Fase II-III

como una solución auspiciosa para aminorar el impacto de las neumococcias en el niño. Sin embargo, frente a la complejidad y al dinamismo de la biología del neumococo, una vigilancia fenotípica y genotípica resultará crucial para evaluar distintas situaciones, en particular aquellas que pueden surgir luego de la aplicación masiva de las vacunas.

Summary

Many prevalent diseases during childhood have been controlled by vaccination yet others are expected to be. Bacteriological laboratories are of fundamental importance to characterize phenotypically and genotypically bacteria, assisting microbiological vigilance before and after vaccination.

The information generated in the Department of Laboratories in Public Health related to *Haemophilus influenzae b*, *Neisseria meningitidis B y C*, y *Streptococcus pneumoniae* has been reviewed to determine microbiological vigilance. Even if *H. influenzae b* is the dominant pathogen within the species, studies were performed to its characterization. Identification and frequency of isolates of *N. meningitidis B* and *C* were of fundamental importance to intervene with vaccines. Serum characterization of isolates of *S. pneumoniae*

in infants with invader pneumococci allowed to determine the potential coverage of combined vaccines and vaccines with protein antigens.

Data obtained by the study confirmed the need to sustain microbiological vigilance of infections controlled by vaccines.

Résumé

Pas mal de maladies de l'enfance ont été contrôlées avec des vaccins, d'autres étant presque contrôlées. Le laboratoire de bactériologie a un rôle fondamental en ce qui concerne la caractérisation phénotype et génotype des bactéries, y contribuant avec la surveillance microbiologique avant et après l'application du vaccin. C'est pourquoi on a révisé l'information issue du Département de Laboratoire de la Santé Publique en ce qui concerne la *Haemophilus influenzae b*, *Neisseria meningitidis B et C*, et *Streptococcus pneumoniae*. Même si *H. influenzae b* en est le pathogène dominant dans l'espèce, on a réalisé des études pour sa caractérisation. L'identification et la fréquence des isolements de *N. meningitidis B* et *C* ont été très importantes pour décider des interventions avec des vaccins. La sérotypification des *S. pneumoniae* isolés chez des enfants à pneumococcies envahissantes a permis de déterminer les couvertures que permettraient les formules des vaccins conjugués, et d'autres avec des antigènes protéiques. Les résultats confirment la nécessité de

maintenir la surveillance microbiologique des infections contrôlées par des vaccins.

Bibliografía

1. **Ruocco G, Curto S, Savio M, Laurani H, Frocht R.** Impacto y experiencia de vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b. Rev Panam Salud Pública 1999; 5: 197-8.
2. **Landaverde M, Di Fabio JL, Ruocco G, Leal I, De Quadros C.** Introducción de la vacuna conjugada contra Hib en Chile y Uruguay. Rev Panam Salud Pública 1999; 5: 200-6.
3. **Hortal M, Camou T, Fajardo C, Palacio R, Pallas C, Palma L, et al.** Caracteres biológicos de *Haemophilus influenzae* aislados de diferentes poblaciones infantiles. Arch Pediatr Uruguay 1993; 64: 15-8.
4. **Camou T, Pallas C, Musser J, Hortal M.** Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b isolates from Uruguay. Rev Microbiol 1996; 27: 106-10.
5. **Borrelli S, Camou T, Hortal M, Jansson PE, Lindberg A.** Frequencies of lipopolysaccharide-defined epitopes in *Haemophilus influenzae* type b and non-typable isolates determined with monoclonal antibodies. Clin Microbiol Infect 1999; 5: 364-0.
6. **Hortal M, Cánepa E, Frabasil S, Chiparelli H, Palacio R, Palma L, et al.** Frecuencia de las infecciones mixtas en la etiología de la neumonía y de la otitis media aguda. Arch Pediatr Uruguay 1993; 64: 3-7.
7. **Prado V, O'Ryan M, Prieto S, Cifuentes M, Arellano C, Masor M, et al.** Portación de *Haemophilus influenzae* tipo b en niños chilenos inmunizados con vacuna Hib conjugada que asisten a jardines infantiles. Libro de resúmenes. Congreso de Infectología, Guatemala: Asociación Panamericana de Infectología, 1999: 53.
8. **Galil K, Singleton R, Levine OS, Fitzgerald MA, Bulkow L, Getty M, et al.** Reemergence of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in a well-vaccinated population in remote Alaska. J Infect Dis 1999; 179: 101-6.
9. **Peltola H.** Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 302-17.
10. **World Health Organization.** Meningococcal disease, serogroup W 135. Weekly Epidemiological Record. 2001; 76: 141-2.
11. **Pisano A.** Identificación y clasificación de cepas de *N meningitidis* durante el período de Enero 1989 a Diciembre 1990. Congreso Latinoamericano de Microbiología, 11, Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 1991: B 65.
12. **Gutiérrez M, Caro E, Rodríguez L, Regueira M, Pisano A.** Classification of *N meningitidis* strains: prevailing serogroups and serotypes in patients from Argentina, Uruguay and Colombia suffering meningococcal disease. International Pathogenic *Neisseria* Conference, 8. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública (México), 1992: 234-40.
13. **Pisano A, Pérez G, Giordano P, Hortal M.** Distribución de serotipos de *N meningitidis B* en Uruguay. Período 1989-1994. Congreso Panamericano de Infectología, 7. Cartagena de Indias: Asociación Panamericana de Infectología, Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica, Asociación Colombiana de Infectología 1995: (c-42:425): 128.
14. **Guevara R, Pisano A, Giordano P, De Los Santos M, Pérez G.** Brote por *N meningitidis C* en Rivera. Rev Med Uruguay 1994; 10: 39-44.

15. **Diez R, López G, Pisano A, Giordano P, Pérez G.** Enfermedad meningocócica en Paysandú. Jornadas de ALACIU, Salto: 1995.
16. **Pisano A, Camou T, Pérez G, Giordano P.** Caracterización molecular de cepas de *N meningitidis* C aisladas en Uruguay y en la región. 1993-1994. Jornadas Científicas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, 7. Piriápolis: Sociedad Uruguaya de Biociencias, 1995: 85.
17. **Fischer TM, Tejedor A, De Boni JA, López T, Purstcher H, Muñoz MJ, et al.** La meningitis del adulto. A propósito de 1.016 observaciones. Gran Premio Nacional de Medicina, 1982. Montevideo: Sociedad Uruguaya de Medicina, 1982. (Edición de tiraje limitado).
18. **Ruocco G.** Vacunas del Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). Congreso Latinoamericano de Patología Clínica, 14, y Congreso de Patología Clínica del Mercosur, 5. Aporte a la Mesa Redonda: Vacunas. Montevideo: Sociedad Uruguaya de Patología Clínica (SUPAC), 2000: 71.
19. **De Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Rosetto Hidalgo NT, Barbosa HA, Tavares Sacchi C, et al.** Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil. *Lancet* 1992; 340: 1074-8.
20. **Lieberman JM, Chiu SS, Wong UK, Partridge S, Chang S-J, Chiu C-Y, et al.** Safety and immunogenicity of a serogroup A/C *N meningitidis* oligosaccharide-protein conjugate vaccine in young children. A randomized controlled trial. *JAMA* 1996; 275: 1499-503.
21. **Pisano A, Pérez G, Giordano P, Hortal M.** Meningitis caused by *N meningitidis* C relatively resistant to penicillin and ampicillin in Uruguay. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 643.
22. **Kertesz D, Di Fabio JL, Brandileone MC, Castañeda E, Echaniz-Aviles G, Heitman I, et al.** Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children. Results of the Pan American Health Organization surveillance study. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1355-61.
23. **Di Fabio J, Castañeda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, et al.** Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, SIREVA-Vigia Group, 1993-1999. *Pediatr Infect Dis J* (en prensa).
24. **Hortal M, Camou T, Palacio R, Dibarboure H, García A.** Ten-year review of invasive pneumococcal diseases in children and adults from Uruguay: clinical spectrum, serotypes and antimicrobial resistance. *Intern J Infect Dis* 2000; 4: 91-5.
25. **Fedson DS, Musser MD.** Pneumococcal vaccine. In: Plotkin SA, Mortimer EA Jr. Eds. *Vaccines*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 517-63.
26. **Shinefield HR, Black S.** Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines in large scale field trials. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 394-7.
27. **Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR.** Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implication for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 100-21.
28. **Klein DL.** Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. *Microb Drug Resist* 1999; 5: 147-57.
29. **Hortal M, Camou T.** Epidemiología molecular de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infect* 2001; 18 (supl 1): 21-4.
30. **Briles DE, King JD, Gray MA, Mc Daniel LS, Swiatto S, Benton KA, et al.** PspA a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine* 1996; 14: 858-67.