

RECYT

Año 18 / N° 25 / 2016 / 28–33

Epidemiología de la Proteína de Superficie Neumocócica a (PspA), en *Streptococcus pneumoniae* Causantes de Infecciones Invasivas en un Hospital Pediátrico de la Argentina

Epidemiology of Pneumococcal Surface Protein a (PspA) IN *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Infections in a Paediatric Hospital in Argentina

Sandra L. Grenon¹, Mónica E. Martínez^{1,2}, Martha H. von Specht^{1,2,*}

1 - Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Av. Mariano Moreno y Av. López Torres, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

2 - Hospital Provincial de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro", Av. Mariano Moreno 110, CP 3300. Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: mvonspecht@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen

Se ha puesto énfasis en la Proteína A de superficie neumocócica (PspA) como componente principal para el desarrollo de una vacuna, con el potencial de ofrecer una amplia protección no relacionada a los serotipos. El objetivo de este trabajo fue conocer la frecuencia y distribución de las familias de PspA, 1 y 2 de *Streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones invasivas pediátricas. Se trabajó con 91 aislamientos del período 2005-2012. Se determinó la sensibilidad a los antibióticos conforme al Clinical and Laboratory Standards Institute, el serotipo mediante la técnica de Quellung, y mediante reacción en cadena de la polimerasa las variantes del gen de PspA. De los aislamientos estudiados, 48 (52,7%) fueron identificados como familia 1, 28 (30,8%) como familia 2 y en 6 (6,6%) no se detectó ninguno de los amplicones buscados. La co-expresión de ambas familias se constató en 9 (10%) aislamientos. La familia 2 presentó frecuencias superiores a las esperadas entre los niños < 2 años y en casos de meningitis ($p > 0,05$). Se evidenciaron 16 serotipos diferentes. El serotipo 14 se asoció a ambas familias. No se detectó diferencia entre la distribución de las familias y los resultados de concentración inhibitoria mínima a penicilina y cefotaxima. La distribución detectada, muestra que el desarrollo de una vacuna basada en las PspA que contenga antígenos de ambas familias 1 y 2, podría ser efectiva en la región.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*; PspA; Enfermedad invasiva; Pediatría.

Abstract

It has been emphasized Pneumococcal Surface Protein A (PspA) as a main component for developing a pneumococcal vaccine with the potential to offer a broad protection unrelated to serotype. The aim of this work was to determine the frequency and distribution of PspA families 1 and 2 of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pediatric infections. We worked with 91 isolates from the period 2005-2012. Antibiotic sensitivity was studied according to the Clinical and Laboratory Standards Institute, serotyping by Quellung technique, and the presence of PspA variant gen was determined by polymerase chain reaction. From the studied isolates, 48 (52.7%) were identified as family 1, 28 (30.8%) as family 2 and in 6 (6.6%) none of the desired amplicon was detected. Expression of both families was found in 9 isolates (10%). Family 2 frequencies were higher than expected among children <2 years and in cases of meningitis ($p > 0.05$). Sixteen different serotypes were detected; serotype 1 was related to family 1 and serotype 7F to family 2. Serotype 14 was associated with both families. No difference between the distribution of families and the results of minimum inhibitory concentration of penicillin and cefotaxime was detected. Our findings showed that the development of a PspA antigens based vaccine, containing both families 1 and 2 would be effective in the region.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; PspA; Invasive disease; Pediatrics.

Introducción

Las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae* representan un serio problema de Salud Pública por las altas tasas de morbilidad y mortalidad que provocan [1, 2]. La Organización Mundial de la Salud [3], estima que

éstas causan alrededor de 1,6 millones de muertes anuales, de las cuales, aproximadamente 800.000 se dan en niños menores de 5 años [4]. En los países en desarrollo, las tasas son de 4 a 10 veces mayores [1, 5, 6]. *S. pneumoniae*, es la primera causa de neumonía extra hospitalaria, provoca el 80-90% de los casos de bacteriemia oculta en niños

menores de 23 meses, y es el primer agente etiológico de meningitis bacteriana en niños, en los países que incluyen la vacunación frente a *Haemophilus influenzae* b en su calendario, y en años de ausencia de brotes epidémicos por *Neisseria meningitidis* [1, 5, 6].

La vacuna de polisacáridos 23 valente y las vacunas a base de polisacáridos conjugados a proteínas, disponibles desde el año 2000, han demostrado ser efectivas contra la infección invasiva neumocócica y para reducir la tasa de resistencia antibiótica [5, 8]. Sin embargo la protección restringida a un número limitado de serotipos, la variación de la distribución de éstos tanto espacial como temporalmente, el reemplazo ocasionado por la presión selectiva de aquellos incluidos en la vacuna y los altos costos de producción, limitan su uso en los países en desarrollo donde la incidencia de esta patología es mayor [4, 9].

Se ha vuelto prioritaria la formulación de una vacuna independiente de serotipos, orientándose el interés hacia las proteínas de superficie [8, 9].

La PspA, es un importante factor de virulencia que interfiere con la deposición del complemento sobre la superficie neumocócica [10, 12]. Ha demostrado ser inmunogénica, y poseer reactividad cruzada en humanos y en varios modelos animales [11, 16]. Basados en las distintas secuencias que adopta la región α -hélice, es posible dividir a las PspA en tres familias (50% de homología entre sí). Las familias 1 y 2 representan cada una casi el 50% de los neumococos estudiados, mientras que la familia 3 comprende alrededor del 1% [7, 14, 15, 17].

Varios estudios han puesto de manifiesto diferencias geográficas en la prevalencia de las familias [18, 30].

Teniendo en cuenta que *S. pneumoniae* es un patógeno relacionado a alta morbi-mortalidad, que la PspA es un inmunógeno estudiado por numerosos grupos a nivel mundial para el desarrollo de nuevas vacunas y considerando su alta variación en las diversas áreas geográficas, se abordó el presente trabajo con el objetivo de conocer la distribución y epidemiología de las familias 1 y 2 de la PspA en los aislamientos de *S. pneumoniae* causantes de infecciones invasivas en un hospital pediátrico de referencia del Norte de la Argentina.

Materiales y Métodos

El Hospital Provincial de Pediatría de Misiones (HPPM; Posadas, Argentina), cuenta con 110 camas, y es centro de referencia en la región. Recibe derivaciones de las localidades del interior de la provincia, del norte de la provincia de Corrientes, y del sur de la República de Paraguay. Atiende en promedio 76.000 consultas ambulatorias y se generan 5.000 egresos por año (Servicio de Estadísticas del HPPM).

Se estudiaron 91 aislamientos de neumococos causantes de enfermedad invasiva en pacientes pediátricos (>1mes y <14 años), internados en el HPPM durante el enero de

2005 y diciembre de 2012 inclusive.

Los pacientes se clasificaron según su edad en: lactantes (<2años), preescolares (≥ 2 y <5 años) y escolares (≥ 5 años).

Se definió como enfermedad invasiva, a toda aquella afección en la cual se haya recuperado *S. pneumoniae* desde un sitio normalmente estéril.

Los aislamientos fueron caracterizados por procedimientos fenotípicos convencionales [31], y remitidos al Instituto Nacional de Referencia "Dr. Carlos G. Malbrán" para ser serotificados de acuerdo al Sistema de Nomenclatura Danés, Statens Serum institut de Copenhague, Dinamarca [32].

La sensibilidad a los antibióticos se determinó mediante técnicas de difusión y dilución conforme a las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)[33]. Se trabajó con monodiscos (Britania, Argentina) de los siguientes antibióticos: oxacilina (OXA, 1 μ g), trimetoprima-sulfametoxazol (TMS, 1,25/23,75 μ g), eritromicina (ERY, 15 μ g), clindamicina (CLI, 2 μ g), tetraciclina (TET, 30 μ g), cloranfenicol (CMP, 30 μ g), vancomicina (VAN, 30 μ g), levofloxacina (LEVO, 5 μ g) y rifampicina (RIFA, 5 μ g). Se realizó el método de doble disco (D-test, CLI - ERY) para investigar los fenotipos M y MLS_B [33]. Se efectuó la determinación de la concentración inhibitoria mínima de penicilina (Richet, Buenos Aires, Argentina) y de cefotaxima (Bristol-Myers Squibb, Buenos Aires, Argentina) mediante macrodilución en caldo [33].

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo el protocolo propuesto por Vela y col. [22]. Los cebadores utilizados para la amplificación fueron: LSM12/SHK63, y LSM12/SHK52, para la familia 1 y familia 2 respectivamente [13]. Como controles, se utilizaron las cepas de referencia R36A y BG11703, provistas por el Laboratorio Nacional de Referencia Instituto "Dr. Carlos G. Malbrán" de Buenos Aires, Argentina [30].

Los productos de PCR se clasificaron como PspA familia 1, PspA familia 2 y PspA familia 1 y 2, o no detectado (PspA-ND).

Para variables categóricas se utilizó la prueba de χ^2 con la corrección de Yates, mediante el programa EpiInfo (TM) 3.5 del CDC Atlanta, Estados Unidos (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

De los aislamientos ensayados, 48 (52%) fueron identificados como familia 1, 28 (31%) como familia 2 y en 6 (7%) no se detectó ninguno de los amplicones buscados. La co-expresión de ambas familias se detectó en 9 (10%) aislamientos.

Las dos familias de PspA se relacionaron con todos los grupos etarios y con todos los diagnósticos, la familia 1 fue la preponderante en todos los grupos ($p > 0,05$). Se observaron frecuencias superiores a las esperadas para

la familia 2 entre los niños menores de 2 años y para la familia 1, entre los niños mayores de 2 años.

En los pacientes diagnosticados con neumonía y sepsis se observó una frecuencia superior a la esperada de aislamientos de la familia 1 ($p>0,05$), y en los casos de meningitis y sepsis, de la familia 2 (tabla 1).

Tabla 1: Distribución de familias de PspA detectadas en aislamientos invasivos pediátricos de *S. pneumoniae* según las variables: género, grupo etario y diagnóstico clínico. 2005-2012 (N=91).

Variables	PspA1	PspA2	PspA1,2	PspA-ND	Total
	n=48	n=28	n=9	n=6	
Razón M/F	0,85:1	1,3:1	0,3:1	2:1	0,94:1
Media edad (meses)	38,8±5,4	30±7,03	35,5±10,1	25,8±9,41	34,9±3,7
Grupo etario					
< 2 años	23	20	5	3	51
≥ 2 < 5 años	14	3	2	2	21
≥5 años	11	5	2	1	19
Diagnóstico					
Neumonía	29	13	4	4	50
Meningitis	11	9	3	2	25
Sepsis	6	4			10
Otros	2	2	2		6

Ref.: pspA-ND (amplicón no detectado); Otros: 1 caso de peritonitis flia 2, 2 casos de peritonitis ambas flias; 1 infección osteoarticular flia 1; infección de piel y partes blandas (un caso flia 1 y otro PspA-ND)

La información respecto al serotipo se obtuvo de 65 casos. Se evidenciaron 19 tipos capsulares diferentes y un aislamiento resultó no tipificable. Los aislamientos portadores del serotipo 1 y del serogrupo 6, se clasificaron casi exclusivamente como de la familia 1 y los del serotipo 7F como de la familia 2 (tabla 2). El serotipo 14 se identificó en aislamientos pertenecientes a ambos tipos familiares, además en 3 aislamientos PspA-ND (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución de serotipos de *S. pneumoniae* según familias de PspA

Serotipo	Familia				Total
	PspA 1	PspA 2	PspA 1 y 2	PspA-ND	
14	10	8	3	3	24
1	5	1	1	1	8
7F	1	3	1	0	5
6 A	3	0	0	0	3
6B	3	0	0	0	3
3	1	2	0	0	3
9V	2	2	0	0	4
19F	1	1	0	0	2
23F	2	0	0	0	2
19A	1	0	0	0	1
18C	0	0	0	1	1
5	2	0	0	0	2
33 A	0	1	0	0	1
33F	0	1	0	0	1
11 A	1	0	0	0	1
18 A	0	1	0	0	1
19V	0	0	1	0	1
22F	1	1	0	0	2
NT	1	0	0	0	1
s/d	14	7	3	1	25
Total	48	28	9	6	91

Ref: NT: no tipificable; s/d: sin datos.

El 60% de los aislamientos presentó CIM de PEN<0,06 mg/ml y el 96% CIM de CTX<0,5 mg/ml.

Se detectó un 29% de resistencia a TET, un 54% a TMS, 26 % a ERY y 1,5% a CLI. No se observó resistencia a LEVO, a RIFA ni a VAN. La distribución de las familias de PspA conforme a los perfiles de sensibilidad de los antibióticos se presentan en la tabla 3 y en la en la figura 1.

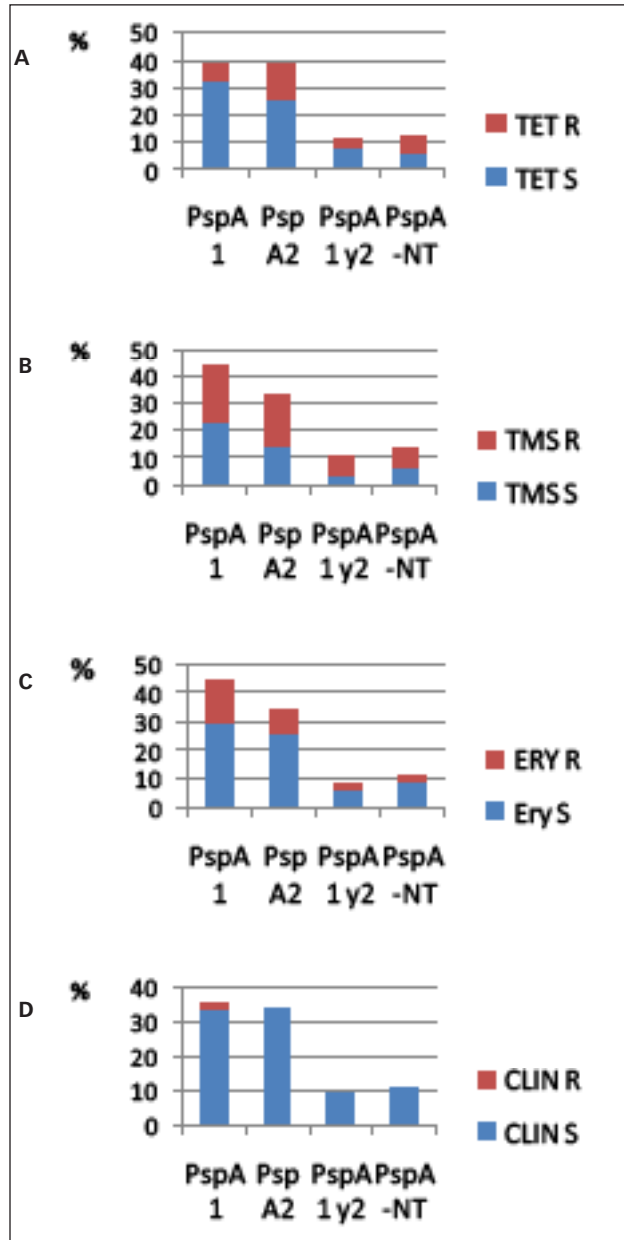


Figura 1: Resistencia porcentual a antibióticos no β-lactámicos en las familias pspA. 1A: tetraciclina, 1B: trimetoprima/sulfametoxazol, 1C: eritromicina, 1D: clindamicina. N=91

Trece pacientes relacionados a los aislamientos estudiados fallecieron a causa de la infección neumocócica, 7 de ellos se vincularon a PspA1, 3 a PspA2, 1 a ambas familias y 2 a PspA-ND.

Discusión

Los datos de la prevalencia y caracterización de las familias de la PspA, están condicionados por diferencias geográficas en las poblaciones, diversidad de métodos de estudio, dificultad para el aislamiento de este microorganismo y la falta de estudios etiológicos con estrictos criterios de selección. Estos aspectos hacen sumamente difícil consensuar los resultados obtenidos hasta el momento [18, 23, 26, 30, 34]. La mayoría de los aislamientos de este trabajo se pudieron clasificar dentro de alguna de las dos familias evaluadas, en un porcentaje menor al comunicado a nivel nacional por Mollerach M. y col [30].

La existencia de aislamientos PspA-ND es consistente con otras publicaciones donde se encuentran en un rango entre el 0 y el 20% [18, 20, 26, 27, 29, 30]. Según algunos autores, esta proporción parece ser mayor entre los aislamientos no invasivos [23].

Los trabajos llevados a cabo en nuestro país, así como también en el extranjero, dan cuenta de una mayor prevalencia de aislamientos portadores de PspA1 [21, 22, 24, 29, 30, 35]. Sin embargo, algunos investigadores observaron resultados totalmente opuestos [19, 25], con una mayor proporción de aislamientos que expresan PspA2. Alternativamente a estos hallazgos, ambos tipos familiares han sido detectados de manera equitativa en un estudio multicéntrico que involucró a varios países, y en trabajos realizados en Alemania, Brasil y Finlandia [15, 18, 20, 23, 27].

La co-expresión de ambas familias, ya ha sido citada tanto por autores nacionales como extranjeros, aunque con diferentes frecuencias [15, 20, 27, 29].

PspA es un factor de virulencia bajo presión selectiva y podría recombinarse independientemente del *background* genético, por lo que se podrían formular hipótesis sobre algún tipo de ventaja selectiva para la evasión del sistema inmune del hospedador e infección posterior [15].

Se ha descrito que las familias de PspA no se relacionan a grupos etarios, género o al origen de los aislamientos [19-21, 27, 29, 35], hallazgos que resultan concordantes con nuestro estudio dado que la mayor frecuencia observada de familia 1 entre las neumonías y pacientes mayores de 2 años, como así de la familia 2 entre las meningitis y pacientes menores de 2 años, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

En lo referido a los serotipos, se han notificado ciertas asociaciones, aunque con discrepancias entre los diferentes autores [18, 20, 21, 23, 26, 30, 35]. Al igual que lo observado en el presente estudio, investigadores extranjeros encontraron relación entre el serotipo 1 y la familia 1 [22, 27, 29] y del serotipo 7F con la familia 2 [29]. La distribución fue equitativa para el serotipo 14 en ambos tipos familiares [20, 22, 29]. Brueggemann y col., encontraron que los serotipos para los cuales existe una aparente asociación tienden a ser aquellos de los cuales existen pocos clones

circulantes. Es decir que cuando los aislamientos de un determinado tipo capsular están similarmente distribuidos entre ambas familias, usualmente representarían linajes clonales diferentes, reduciendo la eventualidad de poseer cualquiera de las familias PspA [36]. Otros investigadores, sin embargo, no encontraron relación alguna entre serotipos y PspA [15, 19, 25], aunque sí entre estas últimas y ciertos genotipos de *S. pneumoniae* [19, 25, 27, 37].

La relación entre el perfil de sensibilidad a PEN y la distribución de las familias de PspA es controversial. Se ha propuesto que podría existir una tendencia, dentro de clones específicos de resistencia, de heredar un tipo familiar en particular. Pimenta y col. [26, 27], hallaron una relación entre la familia 1 y la resistencia a PEN; por otra parte, Brandileone y col. [38] observaron la asociación inversa. Al igual que Hollingshead y col. [20] no obtuvimos hallazgos que avalen estos supuestos [20]. Las diferencias de diseño de los trabajos de Pimenta y Brandileone, podrían estar condicionando esos resultados.

En cuanto a la distribución de las familias de PspA según los perfiles de sensibilidad a antibióticos no β -lactámicos, Ito y col. propusieron, que los aislamientos sensibles y con resistencia moderada a ERY tienden a expresar la familia 2, y los que presentan resistencia alta, la familia 1 [21], situación que no observamos en el presente estudio.

La distribución detectada, muestra que el desarrollo de una vacuna basada en las PspA que contenga antígenos de ambas familias 1 y 2, podría ser efectiva en la región.

Referencias

1. Musher, D.M. *Streptococcus pneumoniae*. In Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin Editors. 2010, Elsevier Philadelphia: Churchill Livingstone p. 2623-7.
2. AlonsoDeVelasco, E.; A.F. Verheul; J. Verhoef and H. Snippe. *Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines*. Microbiol Rev, 1995. 59(4): p. 591-603.
3. WHO. *Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization*. WHO position paper. Weekly epidemiological record 2007 82(12): p. 93-104.
4. Garcia, S.; O.S. Levine; T. Cherian; J.M. Gabastou and J. Andrus. *Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction*. Rev Panam Salud Publica, 2006. 19(5): p. 340-8.
5. S.L.I.P.E. *Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. Manual de Vacunas de Latinoamérica: 2005*. Disponible en: http://www.infectologiapediatrica.com/attachments/manual_vacunas.pdf. [Consulta: julio de 2014]. 3 ed ed. 2004: Organización Panamericana de la Salud.

6. OMS (2008) Organización Mundial de la Salud. Parte Epidemiológico Semanal Volume, 373-384
7. Briles, D.E.; S. Hollingshead; A. Brooks-Walter; G.S. Nabors; L. Ferguson; M. Schilling; S. Gravenstein; P. Braun; J. King and A. Swift. *The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection.* Vaccine, 2000. 18(16): p. 1707-11.
8. Bogaert, D.; P.W. Hermans; P.V. Adrian; H.C. Rumke and R. de Groot. *Pneumococcal vaccines: an update on current strategies.* Vaccine, 2004. 22(17-18): p. 2209-20.
9. Briles, D.E.; R.C. Tart; E. Swiatlo; J.P. Dillard; P. Smith; K.A. Benton; B.A. Ralph; A. Brooks-Walter; M.J. Crain; S.K. Hollingshead and L.S. McDaniel. *Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA).* Clin Microbiol Rev, 1998. 11(4): p. 645-57.
10. Crain, M.J.; W.D. Waltman, 2nd; J.S. Turner; J. Yother; D.F. Talkington; L.S. McDaniel; B.M. Gray and D.E. Briles. *Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae.* Infect Immun, 1990. 58(10): p. 3293-9.
11. McDaniel, L.S.; J.S. Sheffield; E. Swiatlo; J. Yother; M.J. Crain and D.E. Briles. *Molecular localization of variable and conserved regions of pspA and identification of additional pspA homologous sequences in Streptococcus pneumoniae.* Microb Pathog, 1992. 13(4): p. 261-9.
12. McDaniel, L.S.; J.S. Sheffield; P. Delucchi and D.E. Briles. *PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type.* Infect Immun, 1991. 59(1): p. 222-8.
13. Swiatlo, E.; A. Brooks-Walter; D.E. Briles and L.S. McDaniel. *Oligonucleotides identify conserved and variable regions of pspA and pspA-like sequences of Streptococcus pneumoniae.* Gene, 1997. 188(2): p. 279-84.
14. Beall, B.; G. Gherardi; R.R. Facklam and S.K. Hollingshead. *Pneumococcal pspA sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones.* J Clin Microbiol, 2000. 38(10): p. 3663-9.
15. Hollingshead, S.K.; R. Becker and D.E. Briles. *Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in Streptococcus pneumoniae.* Infect Immun, 2000. 68(10): p. 5889-900.
16. Nabors, G.S.; P.A. Braun; D.J. Herrmann; M.L. Heise; D.J. Pyle; S. Gravenstein; M. Schilling; L.M. Ferguson; S.K. Hollingshead; D.E. Briles and R.S. Becker. *Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules.* Vaccine, 2000. 18(17): p. 1743-54.
17. Swiatlo, E.; J. King; G.S. Nabors; B. Mathews and D.E. Briles. *Pneumococcal surface protein A is expressed in vivo, and antibodies to PspA are effective for therapy in a murine model of pneumococcal sepsis.* Infect Immun, 2003. 71(12): p. 7149-53.
18. Heeg, C.; C. Franken; M. van der Linden; A. Al-Lahham and R.R. Reinert. *Genetic diversity of pneumococcal surface protein A of Streptococcus pneumoniae meningitis in German children.* Vaccine, 2007. 25(6): p. 1030-5.
19. Rolo, D.; C. Ardanuy; A. Fleites; R. Martin and J. Linares. *Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain.* BMC Microbiol, 2009. 9: p. 80.
20. Hollingshead, S.K.; L. Baril; S. Ferro; J. King; P. Coan and D.E. Briles. *Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries.* J Med Microbiol, 2006. 55(Pt 2): p. 215-21.
21. Ito, Y.; M. Osawa; R. Isozumi; S. Imai; I. Ito; T. Hirai; T. Ishida; S. Ichiyama and M. Mishima. *Pneumococcal surface protein A family types of Streptococcus pneumoniae from community-acquired pneumonia patients in Japan.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007. 26(10): p. 739-42.
22. Vela Coral, M.C.; N. Fonseca; E. Castaneda; J.L. Di Fabio; S.K. Hollingshead and D.E. Briles. *Pneumococcal surface protein A of invasive Streptococcus pneumoniae isolates from Colombian children.* Emerg Infect Dis, 2001. 7(5): p. 832-6.
23. Melin, M.M.; S.K. Hollingshead; D.E. Briles; W.P. Hanage; M. Lahdenkari; T. Kajjalainen; T.M. Kilpi and H.M. Kayhty. *Distribution of pneumococcal surface protein A families 1 and 2 among Streptococcus pneumoniae isolates from children in Finland who had acute otitis media or were nasopharyngeal carriers.* Clin Vaccine Immunol, 2008. 15(10): p. 1555-63.
24. Onwubiko, C.; C. Shires; L.R. Quin; E. Swiatlo and L.S. McDaniel. *Characterization of Streptococcus pneumoniae isolated from children with otitis media.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. 50(1): p. 119-25.
25. Sadowy, E.; A. Skoczynska; J. Fiett; M. Gniadkowski and W. Hryniewicz. *Multilocus sequence types, serotypes, and variants of the surface antigen PspA in Streptococcus pneumoniae isolates from meningitis patients in Poland.* Clin Vaccine Immunol, 2006. 13(1): p. 139-44.
26. Pimenta, F.C.; F. Ribeiro-Dias; M.C. Brandileone; E.N. Miyaji; L.C. Leite and A.L. Sgambatti de Andrade. *Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil.* J Clin Microbiol, 2006. 44(8): p. 2838-43.
27. Brandileone, M.C.; A.L. Andrade; E.M. Teles; R.C. Zanella; T.I. Yara; J.L. Di Fabio and S.K. Hollingshead. *Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in Streptococcus pneumoniae isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines.* Vaccine, 2004. 22(29-30): p. 3890-6.
28. Payne, D.B.; A. Sun; J.C. Butler; S.P. Singh; S.K. Hollingshead and D.E. Briles. *PspA family typing and PCR-based DNA fingerprinting with BOX A1R primer of pneumococci*

- from the blood of patients in the USA with and without sickle cell disease. *Epidemiol Infect*, 2005. 133(1): p. 173-8.
29. Mayoral, C.; M. Della Bianca; M.R. Baroni; R. Giani; M. Regueira and F. Zalazar. [Pneumococcal surface protein A (PspA) families. Relation with serotypes and clinical site of infection]. *Medicina (B Aires)*, 2010. 70(5): p. 437-41.
30. Mollerach, M.; M. Regueira; L. Bonofiglio; R. Callejo; J. Pace; J.L. Di Fabio; S. Hollingshead and D. Briles. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. *Epidemiol Infect*, 2004. 132(2): p. 177-84.
31. Perilla, M.J.; G. Ajello; C. Bopt; J. Elliot; R.R. Facklam and J.S. Knapj. *Manual de Laboratorio para la identificación y pruebas susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la Salud Pública en el mundo en desarrollo. Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella seropityphi y Vibrio cholerae.* Centro para el control y la Prevención de Enfermedades: Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas., 2004: p. 49 - 67.
32. Grenon, S.; M. von Specht; A. Corso; J. Pace and M. Regueira. [Distribution of serotypes and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children in Misiones, Argentina]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2005. 23(1): p. 10-4.
33. CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22nd Informational Supplement, 2012; M100-S22.* Wayne, PA, EE.UU., 2012.
34. Reid, S.D.; W. Hong; K.E. Dew; D.R. Winn; B. Pang; J. Watt; D.T. Glover; S.K. Hollingshead and W.E. Swords. *Streptococcus pneumoniae* forms surface-attached communities in the middle ear of experimentally infected chinchillas. *J. Infect Dis*, 2009. 199(6): p. 786-94.
35. Mayoral, C.; M.R. Baroni; R. Giani; S. Virgolini; L. Zurbriggen and M. Regueira. [Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections at the Hospital de Niños of Santa Fe]. *Rev Argent Microbiol*, 2008. 40(1): p. 13-6.
36. Brueggemann, A.B. and B.G. Spratt. *Geographic distribution and clonal diversity of Streptococcus pneumoniae serotype 1 isolates.* *J. Clin Microbiol*, 2003. 41(11): p. 4966-70.
37. Dicuonzo, G.; G. Gherardi; R.E. Gertz; F. D'Ambrosio; A. Goglio; G. Lorino; S. Recchia; A. Pantosti and B. Beall. *Genotypes of invasive pneumococcal isolates recently recovered from Italian patients.* *J Clin Microbiol*, 2002. 40(10): p. 3660-5.
38. Brandileone, M.C.; S.T. Casagrande; M.L. Guerra; R.C. Zanella; A.L. Andrade and J.L. Di Fabio. *Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive Streptococcus pneumoniae in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage.* *J Med Microbiol*, 2006. 55(Pt 5): p. 567-74.

Recibido: 28/10/2014

Aprobado: 12/11/2015