



Doença pneumocócica invasiva na era vacinal

João Farela Neves¹, Patrícia Rodrigues², Ana Peres², Cláudia Constantino¹, Florbela Cunha²

1 - Hospital de Dona Estefânia

2 - Hospital de Reynaldo dos Santos

Resumo

Introdução: A incidência da doença pneumocócica invasiva (DPI) em Portugal em 2006 foi estimada em 30,9:100.000 em crianças com menos de 24 meses. Uma vacina conjugada heptavalente contra o *Streptococcus pneumoniae* (PCV7) está disponível desde Fevereiro de 2001 incluindo cerca de 61% dos serotipos responsáveis pela DPI em Portugal.

Objetivos: Avaliar o impacto da DPI na população infantil da área de influência dum hospital geral de nível II da área de Lisboa e vale do Tejo.

Material e Métodos: Análise retrospectiva dos processos das crianças com DPI que recorreram ao serviço de urgência do HRS de 1 de Janeiro de 2001 a 30 de Junho de 2007. Foram estudadas características socio-demográficas, epidemiológicas, clínicas e microbiológicas.

Resultados: Analisámos 18 casos de DPI. Menos de metade dos episódios ocorreram em crianças com idade inferior a dois anos. Apenas 33,3% das crianças pertenciam a um grupo de risco e 22% estavam vacinadas com PCV7. Registaram-se seis casos de meningite, cinco de pneumonia com bacteriémia, um de pneumonia e empiema, três de sépsis, dois de bacteriémia oculta e um de artrite séptica. Ocorreram complicações em 44% dos doentes. Uma criança ficou com sequelas. Não se verificaram óbitos.

Os serotipos não vacinais predominaram (19A, 1 e 3) e 33% das estirpes isoladas eram resistentes à penicilina.

Conclusões: A taxa de incidência anual de DPI na área do HRS foi estimada em 11,8:100.000 crianças, com predomínio de serotipos não vacinais, podendo reflectir a eficácia da actual vacina, mas alertando para a necessidade de uma vacina mais alargada, adequada à realidade nacional.

Palavras chave: Doença pneumocócica invasiva, incidência, grupos de risco, vacina pneumocócica conjugada heptavalente

Acta Pediatr Port 2008;39(5):206-10

Invasive pneumococcal disease in the vaccination era

Abstract

Background and aims: The incidence of invasive pneumococcal disease in Portugal (DPI) in 2006 was estimated to be 30,9:100.000 children under two years of age. The Pneumococcal conjugated vaccine (PCV7) includes about 61% of the serotypes responsible for IPD in Portugal and has a 53% coverage rate in the influence area of our hospital.

Objective: To evaluate the impact of IPD after six years of vaccination.

Methods: Review of the charts of children with DPI admitted in our Hospital from 1st January 2001 to 30th June 2007. Socio-demographic, epidemiologic, clinical and laboratory data were analysed.

Results: Eighteen children had DPI in this period. Less than half of the cases (43%) occurred in children under two years. There was an identifiable risk factor for IPD in 33,3% of the children. There were 4 (22%) children vaccinated with PCV7. There were five pneumonias with bacteraemia and one with empyema, three sepsis, six meningitis, two occult bacteraemia and one septic arthritis with bacteraemia. Complications occurred in 44% of the cases, one child had sequels and there were no deaths. The non-vaccine serotypes (19A, 1, 3) predominated and 33% were penicillin non-susceptible.

Conclusions: The annual incidence of IPD was 11,8:100.000 children, with a predominance of non vaccine serotypes, probably underlining the PCV7 efficacy in protecting against the vaccine serotypes but also alerting for the need of a broader coverage that reflects the Portuguese reality.

Key-words: invasive pneumococcal disease, incidence rate, risk group, pneumococcal conjugated vaccine

Acta Pediatr Port 2008;39(5):206-10

Recebido: 30.10.2007

Aceite: 29.10.2008

Correspondência:

João Farela Neves
Passeio das Garças, Lote 4.38.01 D 6ªA
1990-396 Lisboa, Portugal

Introdução

O *Streptococcus pneumoniae* é o agente mais comum de pneumonia, bacteriémia e sépsis na criança. Desde a introdução da vacina contra o *Haemophilus influenzae* tipo b é também, em muitos países, a causa mais frequente de meningite bacteriana em crianças com idade inferior a dois anos¹.

Como doença pneumocócica invasiva (DPI) entende-se a presença de *Streptococcus pneumoniae* num líquido habitualmente estéril (sangue, líquido cefalo-raquidiano ou pleural). São considerados grupos de risco para DPI as crianças com asplenia (funcional ou anatómica), imuno-suprimidas ou com imuno-deficiência (congénita ou adquirida)². Considera-se ainda que crianças com menos de 60 meses e que frequentem o infantário (quatro ou mais horas por dia) tenham um risco de DPI duas a três vezes superior^{3,4}.

Nos últimos 15 anos tem-se assistido a um aumento global da resistência do *Streptococcus pneumoniae* aos antibióticos⁵, em grande parte relacionado com o seu uso indiscriminado. Na Europa, segundo Cars e colegas., este dado é especialmente importante em França, sendo Portugal o terceiro maior prescriptor de antibióticos⁶.

A primeira vacina comercializada contra *Streptococcus pneumoniae* foi, em 1985, a vacina polissacárida 23-valente (Pneumo23®; UCB pharma), eficaz na protecção contra os 23 serotipos vacinais em crianças acima de 2 anos. Atendendo a que estimula uma resposta independente dos linfócitos T, não induz imunidade em crianças mais jovens e não diminui a prevalência de portadores⁷.

Desde o ano 2000, que existe no mercado uma vacina conjugada com o mutante não tóxico da toxina diftérica, CRM₁₉₇, (Prevenar®; Wyeth company) contra 7 serotipos do *Streptococcus pneumoniae* (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Esta vacina heptavalente (PCV7) induz memória imunológica em crianças acima dos dois meses e reduz a prevalência de portadores para os serotipos vacinais, gerando imunidade de grupo¹⁰. Vários estudos demonstram que também diminui a DPI causada por *Streptococcus pneumoniae* resistentes aos antibióticos¹¹.

Nos EUA, os serotipos incluídos na vacina são responsáveis por cerca de 91% da DPI⁸ e pela quase totalidade dos resistentes à penicilina (especialmente 9V e 23F)⁹. Na Europa esta concordância serotípica é inferior sendo aproximadamente de 64%⁹ e em Portugal cerca de 61%¹⁰, incluindo no entanto, a maioria dos responsáveis pela resistência à penicilina¹².

Disponível no mercado nacional desde Fevereiro de 2001, a vacina conjugada não está incluída no programa nacional de vacinação embora seja recomendada a sua administração às crianças dos grupos de risco para DPI e todas com idade inferior a dois anos¹³.

Objectivos

Avaliar o impacto da DPI na população infantil na área de influência de um hospital geral de nível II da sub-região de saúde de Lisboa e vale do Tejo, nos seis anos que sucederam a comercialização da PCV7.

Material e Métodos

Procedeu-se a uma revisão casuística das crianças com o diagnóstico de DPI que recorreram ao serviço de urgência (SU) do Hospital de Reynaldo dos Santos (HRS) no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2001 e 30 de Junho de 2007. Em 9 dos 18 casos, foi necessário consultar os processos clínicos de outros hospitais devido à transferência para unidades de nível III.

As variáveis sócio-demográficas analisadas foram o local de residência, a raça, a idade e o sexo, bem como a vacinação com PCV7 e com a Pneumo 23®. Analisaram-se ainda os factores de risco para DPI¹⁴: número de irmãos, história de aleitamento materno prévio ou actual, uso de antibióticos ou intercorrências infecciosas no mês anterior e pertencer a um grupo de risco. A distribuição anual e o padrão sazonal da doença também foram registados. Adicionalmente, avaliaram-se as características do quadro clínico, a necessidade de cuidados intensivos e a presença de sequelas ou morte. Registaram-se os resultados dos exames microbiológicos.

O isolamento do *Streptococcus pneumoniae* foi obtido através de cultura em gelose sangue e gelose chocolate, com incubação em 5% de CO₂ durante 24 horas a 35°C. Utilizou-se para o teste de sensibilidade aos antibióticos a difusão em placa com papéis de filtro impregnados de antimicrobianos, sendo o resultado (sensível/intermédio/resistente) dado pelo halo de inibição de crescimento 24 horas após incubação em 5% de CO₂ a 35°C.

A serotipagem, foi feita pela reacção de Quellung de intumescimento capsular com soros monoespecíficos e efectuada no Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge (INSA) ou no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa.

Foi feito o cálculo da incidência anual da DPI com base no número de casos identificados e usando como denominador o número de crianças com menos de 15 anos residentes na área de influência do hospital (concelhos de Vila Franca de Xira, Azambuja, Alenquer, Arruda dos Vinhos e Benavente)¹⁵. Utilizou-se o programa SPSS 11.0®; (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos) para Windows® para efectuar o tratamento estatístico dos dados.

Resultados

Identificámos 18 casos de DPI em crianças com idade inferior a 15 anos que recorreram ao SU do HRS entre um de Janeiro de 2001 e 30 de Junho de 2007. Todas os doentes residiam na área de influência do hospital. Este número corresponde a uma taxa de incidência anual de aproximadamente 11,8:100.000. Houve um ligeiro predomínio de casos do sexo feminino (10 doentes) e de crianças caucasianas (17 casos). A mediana das idades, em anos, foi de 2,5 (p25=0,62; p75=4). As idades mais representadas foram as de crianças com menos de 2 anos (8 casos) e com idade entre 2 e 5 anos (7 casos). Apenas 3 doentes (16,7%) tinham mais de 5 anos e nenhum destes pertencia a grupo de risco conhecido. Os 8 casos de DPI em crianças com menos de dois anos correspondem a uma taxa de incidência anual de cerca de 37,2:100.000 nesse grupo etário.

Os anos com maior número de episódios foram 2002 e 2004, com 5 e 4 casos respectivamente. Nos restantes anos houve 2 casos por ano excepto em 2003 em que só houve 1 caso. Relativamente à variação mensal, 44,5% ocorreram entre Dezembro e Fevereiro.

Neste período, os diagnósticos de DPI encontrados foram: seis casos de meningite, três de sépsis (uma com meningite), cinco doentes com pneumonia e bacteriémia e um com empiema sem bacteriémia, dois casos de bacteriémia oculta e um de artrite séptica bacteriémica.

As crianças com idade entre os 2-5 anos predominaram entre os casos de pneumonia, enquanto os outros diagnósticos ocorreram preferencialmente em doentes com idade inferior a dois anos ($p=0,09$).

De entre os factores de risco para a DPI descritos na literatura destacam-se: 72% das crianças frequentavam o infantário, em 33% dos casos havia referência a doença no mês que antecedeu o internamento (quatro com rinofaringite e dois com otite média aguda) e que, nesse mesmo período, 11% tinham estado sob antibioterapia (um com amoxicilina-ácido clavulânico e um com azitromicina). Pertenciam a um grupo de risco para DPI 33,3% dos doentes: 2 recém-nascidos, 3 crianças com doença crónica (duas com asma brônquica, uma com doença neurológica em estudo e uma com neutropénia persistente secundária a infecção por Citomegalovírus). Somente 22,2% das crianças estavam vacinadas com a PCV7 e nenhuma com a Pneumo 23®. No Quadro I encontra-se a análise dos factores de risco.

Quadro I - Análise dos factores de risco para doença pneumocócica invasiva

Factor de risco	Sim (%)	Não (%)
Nº irmãos (pelo menos 1)	22,2	68,8
Ausência de aleitamento materno	23	77
Frequência de infantário	72,3	27,7
Doença no mês prévio	33	67
Uso antibiótico mês prévio	11	89
Pertencer a grupo de risco	33,3	66,7
Não ter PCV7 ¹	78,8	22,2

1- Vacina conjugada heptavalente

O isolamento do *Streptococcus pneumoniae* foi feito no sangue (12 crianças), no líquido cefalo-raquidiano (6), no líquido pleural (2) e no líquido articular (1), tendo em três casos o isolamento sido feito em mais do que uma localização. Foi possível obter a serotipagem em 9 dos 18 casos, sendo os serotipos isolados: 19A e 3 (3 casos cada), 1 (2 casos) e serotipo 23F (1 caso). A descrição dos diferentes diagnósticos por serotipos encontra-se no Quadro II. Nenhuma das crianças vacinadas com a PCV7 teve DPI provocada por serotipo vacinal e apenas foi isolado um *Streptococcus pneumoniae* cujo serotipo era integrante da vacina (23F) numa criança não vacinada.

A percentagem total de resistência à penicilina e aos macrólidos foi de 33,3%, apresentando 27% sensibilidade intermédia. Todas as estirpes eram sensíveis às cefalosporinas de terceira geração (Quadro III)

Quadro II - Diagnósticos por serotipo de *Streptococcus pneumoniae*

Serotipo <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Diagnóstico
1	Pneumonia com empiema pleural
1	Pneumonia bacteriémica
3	Meningite
3	Meningite
19 A	Meningite
19 A	Sépsis
19 A	Pneumonia bacteriémica
23F	Artrite séptica
15A	Meningite

Quadro III - Resistência aos antibióticos por serotipo

Serotipo (nº casos)	Resistência Penicilina (%)	Resistência Cefalosporinas de 3ª Geração (%)	Resistência Macrólidos (%)
1(2)	0	0	50
3 (2)	0	0	0
19 A (3)	66,7	0	66,7
23F (1)	0	0	100
15A (1)	0	0	0
? (9)	44	0	22
Total (18)	33	0	33

A mediana do número de dias de internamento foi de 15,2 ($p_{25}=9,5$; $p_{75}=23$), verificando-se valores semelhantes para todos os grupos nosológicos.

As complicações precoces ocorreram em 8 doentes, predominando nos casos de meningite (quatro dos seis doentes apresentaram complicações: um caso de coma, um de empiema subdural, um de enfarte cerebral e outro de convulsão após as primeiras 72 horas de doença). Três dos seis doentes com pneumonia tiveram complicações: um caso de empiema pleural, um de derrame pleural e um de insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica.

Não se verificou qualquer relação entre a idade e a ocorrência de complicações precoces, nem global ($p=0,98$), nem relativamente a cada diagnóstico isolado (pneumonia $p=0,66$; meningite $p=0,22$).

Metade dos doentes necessitou de cuidados intensivos. Uma criança ficou com sequelas graves (surdez e atraso grave do desenvolvimento psico-motor pós meningite) e não se registaram óbitos.

Discussão

A DPI na era pós-vacina conjugada continua a apresentar uma morbidade significativa. Durante o período em que decorreu o estudo não se verificaram grandes variações da sua incidência ao longo dos anos, havendo um predomínio nos meses de inverno e nas crianças com idade inferior a dois anos. A exis-

tência de factores de risco para DPI foi encontrada numa parte significativa dos doentes sendo de registar que 2/3 frequentava o infantário e um terço pertencia aos grupos de risco.

De acordo com os trabalhos publicados, a incidência da DPI em vários países diminuiu cerca de 70% após a introdução da PCV7¹⁷. Em Portugal, dadas as limitações dos estudos nacionais (não notificação e pouca investigação diagnóstica efectuada) e consequente sub-estimativa da taxa de incidência (25,9:100.000 crianças com menos de 12 meses)¹⁸, é impossível chegar a conclusões semelhantes. Os dados preliminares do estudo nacional (2006-2007)²⁰ revelaram uma taxa de incidência global de 6,33:100.000, quase duas vezes inferior à relatada no nosso estudo, embora em crianças com idade inferior a dois anos esta taxa seja semelhante (30,9:100.000 versus 37,2/100.000 no HRS). Importa referir que a taxa de incidência calculada para o HRS pode estar sub-valorizada, podendo existir alguns doentes residentes nesta área que tenham recorrido a outros serviços de urgência.

A cobertura vacinal para a PCV7, na área de influência do HRS, foi estimada em 53%¹⁹ (dados do módulo vacinal SINUS referentes aos centros de saúde da área do hospital, num total de 2471 crianças nascidas no ano de 2004), traduzindo a enorme motivação dos profissionais de saúde e a grande adesão dos pais à vacinação.

Os resultados deste trabalho, corroborados pelos dados nacionais recentes e apoiados na cobertura vacinal referida, não deverão representar um aumento na incidência real da DPI. Diversos trabalhos Europeus são unânimes na constatação da diminuição da DPI mas apresentam resultados muito variáveis. Assim, Aristegui F e colegas¹⁷, reportam no País Basco e Navarra (com cobertura vacinal inferior a 40% da população alvo) taxas de incidência cerca de duas vezes superiores às encontradas nos nossos doentes e Vergison e colegas²¹ apresentam incidências quase três vezes superiores. Desta forma, admitimos que tenha havido uma diminuição da incidência de DPI após a introdução da PCV7.

É importante também verificar que os serotipos do *Streptococcus pneumoniae* isolados não estão, na quase totalidade, incluídos na PCV7. Isto atesta a eficácia da PCV7 na protecção contra os serotipos vacinais coadjuvada com a provável imunidade de grupo. Apesar do número reduzido da amostra, parece-nos lógico destacar a predominância dos serotipos 1, 3 e 19A. Estes serotipos já desempenhavam um papel importante na DPI na era pré-vacinal, ocupando respectivamente o terceiro, o sexto e o quinto serotipos mais frequentes¹⁰. Uma vez que não existem dados sobre a real incidência nacional da DPI provocada por estes serotipos antes da introdução da PCV7, não podemos especular se o predomínio encontrado neste trabalho corresponderá a fenómenos de substituição/“switch”²² ou se, por outro lado, estes serotipos passaram a ser os mais prevalentes devido à diminuição dos incluídos na PCV7.

Vários autores^{19,23} têm destacado o papel do serotipo 1, especialmente associado a pneumonia com bacteriemia ou empiema, o que é semelhante ao encontrado no nosso estudo²⁴. O aumento da DPI causada pelo serotipo 19A tem causado alguma apreensão uma vez que este é responsável por grande

parte da resistência do *Streptococcus pneumoniae* aos antibióticos e não é prevenível pela actual vacina conjugada^{5,11,25}. Esta associação também se verificou no nosso estudo, sendo o serotipo 19A o mais frequente e igualmente o maior responsável pela resistência à penicilina e a outros antibióticos.

Importa salientar que a diminuição da DPI, causada por serotipos incluídos na vacina resistentes aos antibióticos, excede largamente o aparente aumento da DPI causada pelos serotipos resistentes aos antibióticos não incluídos na PCV7 (sendo o serotipo 19A o exemplo paradigmático)²⁵. Assim sendo, compete a todos diminuir a pressão selectiva sobre o *Streptococcus pneumoniae* através da prescrição criteriosa, especialmente das cefalosporinas e dos macrólidos, uma vez que estes têm uma capacidade de induzir a resistência aos antibióticos muito superior à amoxicilina, como descrito por Dagan e colegas²⁶.

Conclusões

Este estudo casuístico permitiu avaliar a realidade da DPI na área de influência de um hospital geral de nível II, nos seis anos seguintes à introdução da PCV7.

Atendendo a que a DPI não é uma doença de declaração obrigatória torna-se necessário manter uma vigilância epidemiológica empenhada que permita conhecer a sua real incidência em Portugal. O desenvolvimento de vacinas conjugadas abrangendo um maior número de serotipos e a tendência para a vacinação universal poderão no futuro contribuir para uma redução da DPI.

Agradecimentos

À Prof. Dra. Manuela Caniço do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e ao Prof. Dr. Melo Cristino do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, pela serotipagem dos *Streptococcus pneumoniae*.

À Dra. Margarida Rodrigues, Dra. Florbela Rodrigues e restantes elementos do laboratório de microbiologia do Hospital de Reynaldo dos Santos pelo empenho no isolamento e transporte do *Streptococcus pneumoniae*.

Aos colegas das Unidades de Cuidados Intensivos do Hospital de Santa Maria e Hospital de Dona Estefânia pela permissão de consulta dos processos das crianças transferidas para estes serviços.

Referências

1. Kaplan S, Mason E, Wald E, Schutze G, Bradley J, Tan T *et al*. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004;113:443-9.
2. Committee on Infectious Diseases. Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 2000;106:362-6.
3. Overturf G, the committee on infectious diseases, 1999-2000, ex-officio, Liaisons, Consultant and staff. Technical report: prevention of

- pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 2000;106:367-76.
4. Levine O, Farley M, Harrison L, Lefkowitz L, McGeer A, Schwartz B. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. *Pediatrics* 1999;103:28.
 5. Farrel D, Klugman K, Pichichero M. Increased microbial resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in the pediatric population after the introduction of 7-valent Pneumococcal vaccine in the United States. *Pediatr Inf Dis J* 2007;26:123-8.
 6. Cars O, Molstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet* 2001;357:1851-3.
 7. Pai V, Heyneman C, Erramouspe J. Conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. *Ann Pharm* 2002;36:1403-13.
 8. Recommendations of the advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Preventing pneumococcal disease among infants and young children. MMWR. Recommendations and reports. October 2000;49(RR9):1-38.
 9. Hausdorf P, Bryant J, Kloek C, Paradiso P, Siber G. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis* 2000;30(1):122-40.
 10. Serrano I; Melo CJ, Carriço JA, Ramirez M. Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. *J Clin Microb* 2005;43:1706-15.
 11. Kyaw M, Lynfield R, Chaffer S, Craig A, Hadler J, Reinfold A. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Medicine* 2006;354:1455-63.
 12. Dias R, Louro D, GEMVSA, Caniça M. Serotype and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* recovered from invasive disease in Portugal (1999-2002). In: Abstracts book 43rd Annual ICAAC 2003, Chicago, USA. C2-947^a.
 13. Secção de Infeciologia da Sociedade Portuguesa de Pediatria. Vacinas conjugadas contra *Neisseria meningitidis C* e *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Pediatr Port* 2003;34(5) Separata:1-5.
 14. Levine O, Farley M, Harrison L, Lefkowitz L, McGeer A, Schwartz B. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. *Pediatrics* 1999;103: e28.
 15. Instituto Nacional de estatística online. Acessível em: <http://www.ine.pt/>
 16. Dowell SF, Whitney CG, Wright C, Rose CE Jr, Schuchat A. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. *Emerg Infect Dis* 2003;9:573-9.
 17. Kimberly J. Center. Prevenar TM vaccination: review of the global data, 2006. *Vaccine* 2007;25: 3085-9
 18. Portuguese study group of pneumococcal disease. Invasive pneumococcal disease in children in Portugal 1991-2001. In: Abstracts book 5th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases; 2007 Nov 15-18; Bangkok, Thailand.p.104.
 19. JF Neves, C Constantino, A Peres, F Cunha. Vacina anti-pneumocócica. Que realidade? Comunicação oral no III Encontro de Pediatria do Hospital de Vila Franca de Xira. 2006 Set 29-30; Vila Franca de Xira.
 20. Portuguese study group of pneumococcal disease. Invasive pneumococcal disease in children in Portugal, prospective study 2006-2007. In: Abstracts book 5th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases;2007 Nov 15-18;Bangkok, Thailand.p.104.
 21. Vergison A, Tuerlindor D, Verhaegen J, Malfroot A. Epidemiologic features of invasive pneumococcal disease in Belgian children: passive surveillance is not enough. *Pediatrics* 2006;118:e801-9.
 22. Moore M, Gertz R, Robyn L, Woodbury G, Barkocy-Gallagher A, Schaffner W. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis* 2008;197:1016-27.
 23. Byington C, Spencer L, Johnson T. An epidemiological investigation of sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis* 2002;110:1-6.
 24. Sanchez-Tatay D, Muñoz-Almargo C, Dhillon S, Tarrago D, Esteva C, e al. Molecular epidemiology of paediatric parapneumonic empyema in Spain. In: Kenes international, book of abstracts 25th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases; 2007 may 2-4; Porto. p 28.
 25. Pai R, Moore M, Pilishvili T, Gertz R. Post vaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis* 2005;192:1988-95
 26. Dagan R, Barkai G, Leibovitz E, Dreifuss E, Greenberg D. Will. Reduction of antibiotic use reduce antibiotic resistance? The pneumococcus paradigm. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25: 981-6.