



ORIGINAL

Enfermedad neumocócica invasiva en niños menores de 60 meses, antes y después de la introducción de la vacuna conjugada 13-valente

Johanna Martínez-Osorio^{a,*}, Juan José García-García^{b,c}, Fernando Moraga-Llop^d, Alvaro Díaz^e, Sergi Hernández^f, Anna Solé-Ribalta^a, Sebastià González-Peris^d, Conchita Izquierdo^f, Cristina Esteva^{b,c}, Gemma Codina^d, Ana María Planes^d, Sonia Uriona^d, Magda Campins^d, Pilar Ciruela^f, Luis Salleras^g, Ángela Domínguez^{c,g}, Carmen Muñoz-Almagro^{b,c,h} y Mariona F de Sevilla^{b,c}

^a Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España

^b Malalties Prevenibles amb Vacunes, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, España

^d Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^e Hospital de Nens, Barcelona, España

^f Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Barcelona, España

^g Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^h Departament de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, España

Recibido el 18 de febrero de 2021; aceptado el 20 de mayo de 2021

PALABRAS CLAVE

Vacuna antineumocócica conjugada; VNC; Enfermedad neumocócica invasiva; *Streptococcus pneumoniae*

Resumen

Introducción: La enfermedad neumocócica invasiva (ENI) es la infección bacteriana más relevante en niños pequeños y la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas (VNC) ha cambiado su presentación clínica. En este estudio se analizaron los cambios en la incidencia, características clínicas y distribución de serotipos en los casos de ENI antes y después de la disponibilidad de la VNC13.

Métodos: Se incluyeron prospectivamente pacientes con ENI menores de 60 meses ingresados en 2 hospitales pediátricos terciarios desde enero de 2007 a diciembre de 2009 (período pre-VNC13) y de enero de 2012 a junio de 2016 (período VNC13).

Resultados: Se identificaron 493 casos, 319 en el período pre-VNC13 y 174 en el período VNC13. La incidencia de ENI disminuyó de 89,7 a 34,4 casos por 100.000 habitantes (–62%, $p < 0,001$). Esta disminución de la incidencia se dio por igual en todas las presentaciones clínicas de la

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jmmartinez@sjdhospitalbarcelona.org, johism85@hotmail.com (J. Martínez-Osorio).

<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.05.018>

1695-4033/© 2021 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

enfermedad excepto en la neumonía necrotizante (aumentó de 0,8 a 3,7 casos por 100.000 habitantes). Todos los serotipos incluidos en la VNC13 pero no incluidos en la VNC7 disminuyeron significativamente. No se encontraron diferencias significativas en la estancia hospitalaria, muerte y/o secuelas entre ambos períodos, aunque durante el período VNC13, los pacientes requirieron más días en la unidad de cuidados intensivos pediátricos y de ventilación mecánica ($p=0,00$). La incidencia del serotipo 3 disminuyó de 10,4 a 6,9 casos por 100.000 habitantes, aunque fue el serotipo más frecuente en los pacientes con un cuadro clínico grave.

Conclusiones: Luego de la introducción de la VNC13 se ha producido una disminución significativa de los casos de ENI. El serotipo 3 sigue siendo una causa importante de casos graves de ENI.

© 2021 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Pneumococcal conjugate vaccine; Invasive pneumococcal disease; *Streptococcus pneumoniae*

Invasive pneumococcal disease in children under 60 months before and after availability of 13-valent conjugate vaccine

Abstract

Background: Invasive pneumococcal disease (IPD) is the most important bacterial infection in young children, and the introduction of pneumococcal conjugate vaccines has changed its presentation. This study compared the incidence, characteristics and serotype distribution of IPD before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine (PCV13).

Methods: Prospective enrolment of patients with IPD aged less than 60 months and admitted to either of 2 tertiary care hospitals between January 2007 and December 2009 (pre-PCV13 period) and January 2012 and June-2016 (PCV13 period).

Results: We identified 493 cases, 319 in the pre-PCV13 period and 174 in the PCV13 period. The incidence of IPD decreased from 89.7 to 34.4 cases per 100,000 population (-62% ; $P < .001$). This decrease was observed in all forms of disease except necrotising pneumonia (increase from 0.8 to 3.7 cases/100,000 population). There was a significant reduction in all serotypes included in the PCV13 and not included in the PCV7. We did not find significant differences in length of stay, mortality or the frequency of sequelae between both periods, but in the PCV13 period, the length of stay in the paediatric intensive care unit and the duration of mechanical ventilation were longer ($P = .00$). The incidence of serotype 3 decreased from 10.4 to 6.9 cases per 100,000 population, although it was the serotype involved most frequently in patients with severe disease.

Conclusions: After the introduction of the PCV13, there has been a significant decrease in IPD cases. Serotype 3 continues to be an important cause of severe IPD.

© 2021 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria grampositiva de la que se han identificado más de 95 serotipos capsulares¹. Este agente infeccioso es una causa importante de morbimortalidad tanto en adultos como en niños a nivel mundial, con un espectro clínico amplio que abarca desde la colonización asintomática, pasando por la afección mucosal, a la enfermedad invasiva (en localizaciones previamente estériles)^{2,3}. Antes de la introducción de la vacuna antineumocócica conjugada, *S. pneumoniae* era responsable de entre el 8% y el 12% del total de muertes en menores de 5 años, con una mortalidad anual global estimada de un millón de muertes. En 2008, la mortalidad global estimada fue de 500.000 muertes⁴⁻⁶.

La enfermedad neumocócica invasiva (ENI) es más prevalente en los extremos de la vida, sobre todo en menores de 5 años. Sus presentaciones más frecuentes son la neumonía, la meningitis y la bacteriemia. La introducción de las vacunas neumocócicas conjugadas ha tenido un impacto significativo en la ENI en cuanto a su incidencia y su distribución por serotipos. Tras la introducción de la vacuna antineumocócica conjugada heptavalente (VNC7) en Estados Unidos hubo un descenso dramático en la incidencia de la ENI. No obstante, en nuestro entorno se dio un aumento significativo en la incidencia de ENI causada por serotipos no incluidos en la VNC7, una reducción leve en la incidencia de ENI causada por serotipos de la VNC7 y una emergencia de clones virulentos de serotipos no vacunales previamente estables^{2,7-9}. Con objeto de mejorar la cobertura vacunal

frente a serotipos no incluidos en la VNC7, la vacuna anti-neumocócica conjugada 13-valente (VNC13) se autorizó en 2010 para la inmunización activa de niños de 6 semanas a 5 años de edad. Aunque el Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría recomienda la vacunación sistemática con las vacunas neumocócicas conjugadas (VNC7 en el período 2003-2010 y VNC13 una vez fue autorizada/introducida), en el momento del estudio estas vacunas no estaban financiadas por el sistema de salud pública de Cataluña, salvo en niños con factores de riesgo específicos, por lo que su administración dependía del juicio del pediatra y la voluntad de las familias. La cobertura estimada de la vacuna antineumocócica en Cataluña en niños menores de 60 meses fue del 50% en el período pre-VNC13 y del 63% en el período VNC13 según estudios previos realizados por nuestro grupo⁹⁻¹¹.

El objetivo del presente estudio fue comparar la incidencia y describir las características epidemiológicas, presentación clínica, tendencias actuales y distribución por serotipos de la ENI en niños antes y después de la introducción de la VNC13 en Cataluña, España, entorno en el que dicha vacuna no está incluida en el calendario vacunal sistemático.

Métodos

Muestra y definiciones

Estudio prospectivo en pacientes con ENI menores de 60 meses ingresados en 2 hospitales de referencia terciarios en Barcelona (Cataluña, España) a lo largo de 6 años. El período de estudio se dividió en un período pre-VNC13 (de enero de 2007 a diciembre de 2009) y un período VNC13 (de enero de 2012 a junio de 2016). Los centros participantes fueron el Hospital Sant Joan de Déu y el Hospital Vall d'Hebron, ambos hospitales infantiles de referencia que manejan el 30% del total de ingresos pediátricos en Cataluña, región con una población de 7.500.000 habitantes de los que más de 400.000 son niños menores de 5 años¹². Tras la introducción de la VNC13 en 2010 se estima que la cobertura vacunal en niños menores de 60 meses en Cataluña fue del 55% en el período 2012-2013 y del 78% en 2015^{12,13}.

La ENI se definió como la presencia de hallazgos clínicos de infección junto con la detección de *S. pneumoniae* en cualquier fluido corporal normalmente estéril^{2,10,12}. La detección microbiológica se definió como aislamiento mediante cultivo de alguna cepa de *S. pneumoniae* y/o detección mediante reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR) del gen *ply* y/o el gen *lyta* y un gen capsular adicional de *S. pneumoniae*.

El estado vacunal de cada paciente se obtuvo del carnet vacunal o del registro del centro de salud. En Cataluña, la inmunización con VNC13 o VNC7 se realiza mediante un esquema 3 + 1, con administración de 3 dosis en los primeros 6 meses de vida (a los 2, 4 y 6 meses de edad) seguidas de una dosis de refuerzo entre los 12 y 15 meses de edad. El fallo vacunal de la VNC se definió como enfermedad en un individuo correctamente vacunado, como recomiendan el Council for the International Organizations of Medical Sciences y el

grupo de trabajo de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹⁴⁻¹⁶.

Confidencialidad y aspectos éticos

El estudio no implicó la realización de pruebas complementarias o la obtención de muestras, más allá de las requeridas para el manejo habitual de la enfermedad, en ninguno de los pacientes. El protocolo se adhirió a los principios de la Declaración de Helsinki y la legislación internacional vigente en derechos humanos, biomedicina y protección de datos personales y fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) de la Fundació Sant Joan de Déu. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres o tutores legales de los participantes (casos y controles). Se mantuvo la confidencialidad de todos los datos, que fueron anonimizados.

Recogida de datos

Para cada paciente se recogieron datos generales y clínicos al ingreso, al alta y a los 6 meses del alta. Las variables epidemiológicas fueron la edad, el sexo, el estado vacunal frente a *S. pneumoniae* (en caso de haberse registrado), comorbilidades (con clasificación en 2 grupos de riesgo de acuerdo con los criterios de la Academia Americana de Pediatría)¹⁴⁻¹⁶, asistencia a la guardería, tratamiento antibiótico y/o infección respiratoria previa a la ENI, lactancia materna, presentación clínica de la ENI y antecedentes médicos.

Las variables clínicas incluyeron la presentación clínica, estancia hospitalaria, ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI), complicaciones, antibioterapia al ingreso y al alta, muerte y presencia de secuelas a los 180 días del alta. También se recogieron datos microbiológicos sobre los serotipos de *S. pneumoniae* identificados y la susceptibilidad a la penicilina y la cefotaxima.

Pruebas microbiológicas

Todos los aislados neumocócicos se identificaron mediante los mismos métodos microbiológicos durante el seguimiento, que incluían la prueba de sensibilidad a la optoquina y una prueba antigénica para la identificación del polisacárido capsular (Slidex pneumo-kit, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). La detección del ADN de *S. pneumoniae* se realizó mediante RT-PCR con métodos descritos previamente, incluyendo la amplificación del gen de la neumolisina (*ply*) o el de la autolisina (*lyta*)^{17,18}. Las cepas aisladas en cultivo fueron serotipificadas mediante la reacción de Quellung en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, España). En casos diagnosticados exclusivamente mediante RT-PCR se emplearon métodos previamente validados para la detección de serotipos neumocócicos^{19,20}. En el período pre-VNC13, el protocolo de PCR incluyó la detección de ADN en la región conservada del gen capsular *wzg* y otros genes de *S. pneumoniae* seleccionados para distinguir 24 serotipos (1, 3, 4, 5, 6A/C, 6B/D, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A y 23F). En el período VNC13, el protocolo había mejorado y permitía

la identificación de 40 serotipos en muestras con una alta carga de ADN bacteriano, definida como un umbral del ciclo ≤ 30 (1, 2, 3, 4, 5, 6A/6B, 6C, 7C/(7B/40), 7F/7A, 9N/9L, 9V/9A, 10A, 10F/(10C/33C), 11A/11D, 12F/(12A/44/46), 13, 16F, 17F, 18/(18A/18B/18C/18F), 19A, 19F, 20(20A/20B), 21, 22 (22F/22A), 23A, 23B, 24/(24A/24B/24F), 31, 34, 35A/(35C/42), 35B, 35F/47F, 38/25F, 39)^{19,21}.

La susceptibilidad a la penicilina y las cefalosporinas de tercera generación se definió mediante los puntos de corte meníngeos establecidos por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en 2015, empleándose como control el American Type Culture Collection 49619 (serotipo 19F). La resistencia a la penicilina se definió como una concentración mínima inhibitoria (CMI) $\geq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$ y la resistencia a la cefotaxima como una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ ²².

Análisis estadístico

Las variables categóricas se describieron por medio de frecuencias absolutas y porcentajes, y las continuas por medio de la media y desviación estándar (DE). La comparación entre grupos de las variables categóricas se realizó mediante la prueba chi cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher según procediese, y las diferencias en las variables continuas se evaluaron mediante la prueba *U* de Mann-Whitney. Los *p*-valores $\leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La incidencia de la ENI, definida como el número de casos por 100,000 habitantes, se calculó con las estimaciones anuales para la población pediátrica, obtenidas del Instituto de Estadística de Cataluña, y la proporción del total de ingresos en niños menores de 5 años correspondiente a los 2 hospitales participantes²³. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 18.0 (IBM Corp) y OpenEpi 3.0²⁴.

Resultados

Durante el período de estudio se detectaron 493 casos de ENI, 319 en el período pre-VNC13 y 174 en el período VNC13. Se documentó el serotipo en 395 de los casos (245 en el período pre-VNC13 y 150 en el período VNC13). La [tabla 1](#) presenta el análisis de las características de base. Se observaron diferencias en la lactancia materna, la asistencia a guardería o colegio, el antecedente de infección respiratoria, los factores de riesgo de enfermedad neumocócica, el diagnóstico microbiológico y el tipo de muestra en el que se realizó la detección.

Estado vacunal

En el primer período, 131 casos (44,7%) ocurrieron en pacientes vacunados correctamente para su edad con la VNC7, y 3 de los casos se asociaron a serotipos incluidos en la VNC7 (2,3% de fallos vacunales). En el segundo período, 49 casos (32%) ocurrieron en pacientes vacunados correctamente para su edad con la VNC13, de los que 12 fueron causados por serotipos vacunales (24% de fallos vacunales, con 10 casos [83,3%] causados por el serotipo 3). La [tabla suplementaria](#) resume las características de los niños con vacunación completa que desarrollaron ENI.

Incidencia

La incidencia de ENI, en total y por presentación clínica, se presenta en la [tabla 2](#). En el período pre-VNC13, la incidencia de ENI aumentó entre 2007 y 2009: 76,2 casos por 100.000 habitantes en 2007, 82,1 casos por 100.000 habitantes en 2008 y 109,8 casos por 100.000 habitantes en 2009. En el período VNC13, la incidencia disminuyó gradualmente de 39,6 casos por 100.000 habitantes en 2012 a 29,7, 32,5, 36,2 y 33 casos por 100.000 habitantes en 2013, 2014, 2015 y 2016, respectivamente.

La incidencia de la ENI tras la introducción de la VNC13 descendió de 89,7 a 34,4 casos por 100.000 habitantes, lo que corresponde a una reducción del 62% (intervalo de confianza del 95% [IC 95], -69% a -54%; $p < 0,001$).

La [tabla 3](#) resume los cambios observados en la frecuencia de los serotipos incluidos en la VNC13. La frecuencia de los serotipos 3, 1, 19A, 7FA, 5, 6A/C y 19F decreció significativamente, mientras que los cambios en los restantes serotipos de la VNC13 no fueron significativos.

La mayoría de los casos de ENI en el período pre-VNC13 fueron causados por serotipos incluidos en la VNC13. Tras la introducción de la VNC13 se observó una disminución global significativa en la ENI causada por los serotipos de la VNC13, sin evidencia de reemplazo de serotipos.

Presentación clínica y evolución

La presentación clínica difirió entre los 2 períodos, disminuyendo la incidencia de neumonía (de 71,3 a 23,7 casos/100.000 habitantes; $p < 0,001$), meningitis (de 8,1 a 3,5 casos/100.000 habitantes; $p = 0,002$) y de bacteriemia oculta (de 7,0 a 3,5 casos/100.000 habitantes; $p = 0,012$). La incidencia de neumonía complicada con empiema descendió de 47,7 a 11,4 casos por 100.000 habitantes ($p < 0,001$) del total de casos de neumonía. Hubo un aumento considerable en la incidencia de casos de neumonía necrotizante durante el seguimiento (de 0,8 a 3,7 casos/100.000 habitantes; $p = 0,004$) que supuso un aumento del 340% (IC 95, 30-1.400%) entre los 2 períodos. No hubo cambios significativos en la incidencia de shock séptico o infección osteoarticular durante el estudio ([tabla 2](#)).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la estancia hospitalaria media, la mortalidad o la frecuencia de secuelas entre ambos períodos, aunque en el período VNC13 los pacientes requirieron más días en la UCI y de ventilación mecánica ($p = 0,00$) ([tabla 1](#)).

Serotipos, pruebas moleculares y susceptibilidad a antimicrobianos

Se realizó serotipificación en 466 (94,5%) del total de casos de ENI, 297 (94%) en el primer período y 169 (97,1%) en el segundo. Los serotipos identificados con mayor frecuencia fueron el 1 (62; 20,9%), el 19A (47; 15,8%) y el 3 (37; 12,5%) en el período pre-VNC13 y el 3 (35; 20,7%), el 1 (19; 11,2%) y el 19A (16; 9,5%) en el período VNC13. Los serotipos incluidos en la VNC13 causaron 209 (70,3%) de los 297 casos en el período pre-VNC13, mientras que en el período VNC13 los serotipos vacunales fueron responsables de 98 (57,9%) de los 169 casos de ENI ([tabla 3](#)).

Tabla 1 Características basales, diagnóstico microbiológico y evolución

	Período pre-VNC13 n= 319	Período VNC13 n= 174	p-valor
Características basales			
<i>Edad, media ± DE (meses)</i>	29,6 ± 15,7	27,5 ± 16,2	0,16
≤ 24 meses, n (%)	129 (40,5)	82 (47,1)	0,31
25-59 meses, n (%)	190 (59,5)	92 (52,8)	
<i>Sexo, n (%)</i>			0,06
Varón	170 (53,3)	108 (62,1)	
Mujer	149 (46,7)	66 (37,9)	
<i>Lugar de nacimiento, n (%)</i>			0,37
España	298 (93,4)	164 (94,3)	
Fuera de España	21 (6,6)	10 (5,7)	
<i>Temporada del ingreso, n (%)</i>			
Enero-marzo	106 (33,2)	65 (38)	0,35
Abril-junio	63 (19,7)	46 (26,4)	0,08
Julio-septiembre	24 (7,5)	9 (5,2)	0,18
Octubre-diciembre	126 (39,5)	54 (31)	0,06
<i>Enfermedad subyacente, n (%)</i>			0,71
Grupo de riesgo 2 ^a	4 (1,3)	10 (5,7)	0,00
Grupo de riesgo 1	0	0	-
<i>Lactancia materna, n (%)</i>	224 (73,4)	142 (81,6)	0,01
<i>Asistencia a guardería o colegio, n (%)</i>	244 (79)	111 (64,5)	0,00
<i>Infección respiratoria en el mes anterior, n (%)</i>	142 (45,8)	98 (56,3)	0,01
<i>Antibioterapia en el mes anterior, n (%)</i>	49 (15,8)	25 (14,4%)	0,15
Diagnóstico microbiológico			
<i>Identificación de S. pneumoniae, n (%)</i>			
Solo mediante cultivo	54 (16,9)	46 (26,4)	0,01
Solo mediante PCR	206 (64,6)	84 (48,3)	0,00
Mediante cultivo + PCR	59 (18,5)	44 (25,3)	0,07
<i>Origen de las muestras positivas, n (%)</i>			
Sangre	103 (32,3)	86 (49,4)	0,00
Líquido pleural	181 (56,7)	66 (37,9)	0,00
Líquido cefalorraquídeo	29 (9,1)	15 (8,6)	0,46
Líquido articular	5 (1,6)	4 (2,3)	0,33
Cavidad mastoidea	0 (0)	2 (1,1)	0,04
Otro	1 (0,2)	1 (0,7)	0,26
Evolución			
<i>Estancia hospitalaria, media ± DE (días)</i>	10,8 ± 7,5	12,2 ± 9,6	0,07
<i>Ingreso en la UCI, n (%)</i>	43 (13,5)	41 (23,7)	0,00
<i>Estancia en la UCI, media ± DE (días)</i>	5,5 ± 6	6,9 ± 9	0,40
<i>Ventilación mecánica, n (%)</i>	4 (1,3)	10 (5,7)	0,00
<i>Mortalidad, n (%)</i>	4 (1,3)	2 (1,2)	0,93
<i>Secuelas tras el alta, n (%)</i>	33 (10,3)	17 (9,9)	0,39

DE: desviación estándar; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; UCI: unidad de cuidados intensivos; VNC13, vacuna neumocócica conjugada 13-valente. En negrita se resaltan las variables con significancia estadística.

^a Grupos de riesgo definidos según los criterios de la Academia Americana de Pediatría¹⁶.

Se observó una disminución en los casos de ENI causados por serotipos contenidos en la VNC13. Las mayores reducciones correspondieron a los serotipos 1, 19A, 7F/A y 5. Las proporciones de casos originados por los principales serotipos patogénicos también cambiaron de manera significativa. La proporción de casos de ENI causados por el serotipo 1 disminuyó del 20,9% al 11,2% en el período VNC13 ($p < 0,001$), mientras que la proporción de casos causados por el serotipo 3 aumentó del 11,5% al 20,7% ($p = 0,01$).

En cuanto a la ENI grave, el serotipo 3 fue el más frecuente en los pacientes que requirieron ingreso en la UCI (15,2%), ventilación mecánica (33%) o estancias prolongadas (27,4%), que desarrollaron complicaciones durante el ingreso (20,7%) o con secuelas tras el alta (20,8%) (tabla 4).

No se dieron diferencias significativas en la frecuencia de resistencia a la penicilina o la cefotaxima (tabla 5).

Tabla 2 Incidencia según la presentación clínica

	Período pre-VNC13		Período VNC13		Cambio, % (IC 95)	p-valor
	Casos, n (%)	Incidencia ^a	Casos, n (%)	Incidencia ^a		
Incidencia de ENI^a	319 (64,7)	89,7	174 (35,3)	34,4	-62% (-69% a -54%)	< 0,001
Neumonía	254 (79,6)	71,3	120 (69)	23,7	-67% (-74% a -59%)	< 0,001
Neumonía con empiema	170 (53,3)	47,7	58 (33,3)	11,4	-76% (-83% a -68%)	< 0,001
Neumonía necrotizante	3 (0,9)	0,8	19 (10,9)	3,7	340% (30% a 1.400%)	0,004
Meningitis	29 (9,1)	8,1	18 (10,3)	3,5	-57% (-76% a -22%)	0,002
Bacteriemia oculta	25 (7,8)	7,0	18 (10,3)	3,5	-50% (-73% a -8%)	0,012
Shock séptico	3 (0,9)	0,8	6 (3,4)	0,1	-40% (-65% a 3.058%)	0,313
Infeción osteoarticular	6 (1,9)	1,6	7 (4)	1,3	-18% (-73% a 140%)	0,361
Mastoiditis	0 (0)	0	5 (2,9)	0,9	---	0,030
Celulitis	2 (0,7)	0,56	0 (0)	0	---	0,004

ENI: enfermedad neumocócica invasiva; IC 95: intervalo de confianza del 95%; VNC13: vacuna neumocócica conjugada 13-valente. En negrita se resaltan las variables con significancia estadística.

^a Casos por 100.000 habitantes.

Discusión

Aunque la cobertura vacunal en nuestro entorno no es alta, la incidencia de ENI en niños menores de 60 meses ha disminuido significativamente tras la introducción de la VNC13. Las características generales de la población fueron similares en ambos períodos.

La neumonía, la meningitis y la bacteriemia oculta sumaron más del 90% de los casos de ENI en ambos períodos. Se observó una reducción significativa en los casos de neumonía complicada con empiema asociada a cambios en la distribución de serotipos causantes de ENI en el período VNC13 (declive del serotipo 1), consistente con la literatura previa²⁵⁻²⁷, mientras que los casos de neumonía necrotizante aumentaron considerablemente de 0,84 a 3,3 casos por 100.000 habitantes. Aunque no hubo cambios en la estancia hospitalaria y la mortalidad con la introducción de la VNC13, se observó un aumento relativo en la gravedad, reflejado en el incremento en los pacientes que requirieron ingreso en la UCI o ventilación mecánica o que desarrollaron shock séptico. Hay que resaltar que también se registró un aumento significativo en la proporción de niños con factores de riesgo. Cabe asumir que los cambios en la presentación clínica se habrían debido a la introducción de la VNC13, que se asoció con un cambio en la distribución de serotipos causantes de ENI. En el período VNC13, serotipos oportunistas o con un potencial invasivo bajo causaron enfermedad con una frecuencia significativamente mayor en pacientes con una prevalencia mayor de comorbilidades, lo que a su vez podría asociarse a un riesgo mayor de complicaciones y mortalidad^{28,29}. Consideramos que el aumento en los casos causados por el serotipo 3 podría haber tenido un efecto significativo en el aumento de la frecuencia (absoluta y relativa) de esta presentación clínica entre los 2 períodos (de 3 [0,8%] a 19 [10,9%]) a pesar del descenso en la incidencia global de ENI, lo que sugiere que podría haber otros factores implicados en el aumento de la neumonía necrotizante, como la mayor proporción de pacientes con comorbilidades en el período VNC13.

Globalmente, el uso de la PCR para la detección de ADN neumocócico aumentó la frecuencia de casos de ENI con confirmación microbiológica, tal como se ha descrito

previamente¹⁷. No obstante, en el período VNC13 se registró un aumento menor de los casos detectados exclusivamente por medio de la PCR. Esto podría deberse a la disminución de casos que se presentaron con empiema, ya que la PCR para la detección de ADN neumocócico es significativamente más sensible en muestras de líquido pleural (en las que cabe esperar una carga bacteriana alta) en comparación con las de sangre, en las que la carga bacteriana es menor.

Se observó una disminución global en la incidencia de la ENI causada por serotipos incluidos en la VNC13, con un descenso en el serotipo 1, que pasó de ser el más frecuente (20,9%) en el período pre-VNC13 a provocar tan solo el 11,2% de los casos de ENI en el período VNC13. Aunque hubo una disminución significativa en la incidencia de ENI causada por el serotipo 3, este serotipo fue el más prevalente en el período VNC13, provocando el 20,9% de los casos de ENI. Este aumento proporcional podría deberse a la tasa de fallo vacunal de la VNC13 respecto al serotipo 3 observada en el estudio, un fenómeno que ya ha sido descrito por nuestro grupo y otros autores^{12,30,31}. Las causas del fallo vacunal de la VNC13 frente al serotipo 3 no se conocen bien, pero probablemente implican una menor inmunogenicidad del serotipo 3 en la vacuna¹².

El serotipo 3 fue el más frecuente, especialmente en los casos más graves, como los de aquellos pacientes que requirieron ingreso en la UCI, ventilación mecánica u hospitalización prolongada, o que desarrollaron complicaciones durante el ingreso o secuelas tras el alta. Esta combinación de una incidencia alta con una proporción grande de casos graves fue uno de los hallazgos más relevantes del estudio.

Entre las limitaciones del estudio se encuentra la variación en los métodos empleados para la detección de ADN neumocócico en la serotipificación durante el período de estudio. En el primer período se empleó la amplificación del gen *ply*, con una alta sensibilidad, y un ensayo de PCR multiplex para la detección de 24 serotipos, mientras que en el segundo se empleó la amplificación del gen neumocócico *LytA*, que ofrece una mayor especificidad, y un ensayo molecular diferente para la detección de 40 serotipos. Este cambio metodológico puede haber contribuido a la reducción significativa en los casos de ENI causados por serotipos no incluidos en el ensayo.

Tabla 3 Distribución de casos de ENI por serotipo

Serotipo	Período pre-VNC13		Período VNC13		Cambio, % (IC 95)	p-valor
	Casos, n (%)	Incidencia ^a	Casos, n (%)	Incidencia ^a		
<i>Serotipos incluidos en la vacuna VNC13, n (%)</i>						
3	37 (12,5)	10,4	35 (20,7)	6,9	-34% (-59% a 0%)	0,041
1	62 (20,9)	17,4	19 (11,2)	3,7	-79% (-88% a -64%)	< 0,001
19A	47 (15,8)	13,2	16 (9,5)	3,1	-77% (-87% a -58%)	< 0,001
7FA	21 (7,1)	5,9	3 (1,8)	0,5	-90% (-98% a -67%)	< 0,001
5	9 (3)	2,5	0 (0)	0	---	< 0,001
6A/C	6 (2,0)	1,6	2 (0,6)	0,3	-77% (-96% a 10%)	0,026
19F	9 (3)	2,5	4 (2,4)	0,7	-69% (-90% a 0%)	0,020
14	12 (4,0)	3,3	14 (8,3)	2,7	-18% (-63% a 70%)	0,307
6B/D	0 (0)	0	2 (1,2)	0,3	---	0,118
18C/B	1 (0,3)	0,2	1 (0,6)	0,1	-30% (-96% a 100%)	0,401
9V/A	2 (0,7)	0,5	2 (1,2)	0,3	-30% (-91% a 390%)	0,361
23F	3 (1)	0,8	1 (0,6)	0,1	-77% (-98% a 120%)	0,085
4	0 (0)	0	1 (0,6)	0,1	---	0,200
<i>Serotipos no incluidos en la vacuna VNC13, n (%)</i>						
10A	2 (0,7)	0,5	6 (3,6)	1,1	110% (-58% a 940%)	0,17
24F	1 (0,3)	0,3	4 (2,4)	0,8	180% (-70% a 2410%)	0,17
11A	0 (0)	0	4 (2,4)	0,8	---	0,04
33F	0 (0)	0	2 (1,2)	0,4	---	0,11
24A	1 (0,3)	0,2	2 (1,2)	0,4	40% (-88% a 1452%)	0,38
23B	3 (1)	0,8	3 (1,8)	0,6	-30% (-86% a 248%)	0,33
15A	2 (0,7)	0,5	2 (1,2)	0,4	-30% (-91% a 399%)	0,36
15C	1 (0,3)	0,3	1 (0,6)	0,2	-30% (-96% a 100%)	0,40
22F	1 (0,3)	0,3	2 (1,2)	0,4	40% (-88% a 1452%)	0,38
38	1 (0,3)	0,3	2 (1,2)	0,4	40% (-88% a 1452%)	0,38
12F/A/44/46	0 (0)	0	3 (1,8)	0,6	---	0,07
6C	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
8	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
13	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
15B	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
16F	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
31	0 (0)	0	2 (1,2)	0,4	---	0,11
27	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
25F	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
35B	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
24	0 (0)	0	2 (1,2)	0,4	---	0,11
9V/A	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
6A/C	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
33AF/37	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
35F	0 (0)	0	1 (0,6)	0,2	---	0,20
24B	1 (0,3)	0,3	0 (0)	0	---	0,11
28	1 (0,3)	0,3	0 (0)	0	---	0,11
<i>Serotipos incluidos en el ensayo, n (%)</i>						
SNIE	74 (24,9)	20,7	24 (14,2)	4,7	-78% (-86% a -64%)	0,00

ENI: enfermedad neumocócica invasiva; IC 95: intervalo de confianza del 95%; SNIE: serotipo no incluido en ensayo de serotipificación; VNC13: vacuna neumocócica conjugada 13-valente. En negrita se resaltan las variables con significancia estadística.

^a Número de casos por 100.000 habitantes.

En conclusión, en el período VNC13 la incidencia de la ENI disminuyó en ausencia de reemplazo de serotipos. Se observaron cambios en las características epidemiológicas y manifestaciones clínicas, con un aumento proporcional de casos en pacientes con factores de riesgo y un aumento de

casos de neumonía necrotizante, que requirieron ingreso en la UCI y ventilación mecánica con mayor frecuencia.

Ahora queda analizar lo que ocurrirá en los próximos años tras la inclusión de la VNC13 en el calendario vacunal sistemático de Cataluña desde julio de 2016.

Tabla 4 Distribución de los serotipos más frecuentes según la evolución clínica

Resultado	Serotipo	Pacientes, n (%)	Resultado	Serotipo	Pacientes, n (%)
Ingreso en la UCI <i>n</i> = 79	19A	13 (16,4)	Sin ingreso en la UCI <i>n</i> = 387	1	77 (19,8)
	3	12 (15,1)		3	60 (15,5)
	7F	5 (6,3)		19A	50 (12,9)
	19F	4 (5,0)		14	23 (5,9)
	1	4 (5,0)		7FA	9 (2,3)
Ventilación mecánica <i>n</i> = 12	3	4 (33,3)	Sin ventilación mecánica <i>n</i> = 454	1	81 (17,8)
	7F	1 (8,3)		3	68 (15)
	19A	1 (8,3)		19A	62 (13,7)
	11A	1 (8,3)		14	25 (5,5)
	14	1 (8,3)		19F	12 (2,6)
Estancia prolongada > 14 días <i>n</i> = 95	3	26 (27,4)	Estancia < 14 días <i>n</i> = 371	1	71 (19,1)
	19A	16 (16,8)		19A	47 (12,7)
	1	10 (10,5)		3	46 (12,4)
	7F	5 (5,3)		14	21 (5,7)
	14	5 (5,3)		19F	10 (2,7)
Complicaciones <i>n</i> = 324	3	66 (20,7)	Sin complicaciones <i>n</i> = 142	19A	20 (14,1)
	1	66 (20,7)		1	14 (9,9)
	19A	43 (13,3)		19F	10 (7,0)
	14	19 (5,9)		14	7 (4,9)
	7FA	10 (3,1)		10A	6 (4,2)
Secuelas tras el alta <i>n</i> = 48	3	10 (20,8)	Sin secuelas <i>n</i> = 418	1	79 (18,8)
	19A	6 (12,5)		3	62 (14,8)
	7FA	3 (6,2)		19A	56 (13,3)
	14	3 (6,2)		14	22 (5,2)
	7F	3 (6,2)		19F	12 (2,8)

UCI: unidad de cuidados intensivos. En negrita se resaltan las variables con significancia estadística.

Tabla 5 Susceptibilidad a los antimicrobianos de 208 cepas neumocócicas invasivas

	Período pre-VNC13	Período VNC13	<i>p</i> -valor
Realización de antibiograma, <i>n</i> (%)	125 (39,2)	83 (47,7)	0,08
Susceptibilidad antibiótica ^a			
Penicilina, CMI, media ± DE (μg/ml)	0,42 ± 0,79	0,55 ± 1,15	0,33
Resistencia a la penicilina, <i>n</i> (%)	41 (34,5)	41 (47,1)	0,06
Cefotaxima, CMI, media ± DE (μg/ml)	0,26 ± 0,41	0,42 ± 1	0,12
Resistencia a la cefotaxima, <i>n</i> (%)	2 (1,7)	5 (5,7)	0,11

CMI: concentración mínima inhibitoria; DE: desviación estándar; VNC13: vacuna neumocócica conjugada 13-valente.

^a Susceptibilidad definida mediante los puntos de corte del CLSI de 2015²².

Financiación

Trabajo financiado por el Plan Nacional de Investigación, Desarrollo e Innovación de España (proyectos PI11/02081, PI11/02345 y PI13/01729) a través del Instituto de Salud Carlos III (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Contribuciones de los autores

Johanna (J) Martínez-Osorio, médico*: Diseño y metodología, recogida de datos, redacción y análisis de datos. Mariona (M) F de Sevilla, doctora*: Diseño y metodología, recogida de datos, redacción y análisis de datos. Fernando (F) Moraga-Llop, médico: Conocimiento experto, comentario constructivo y redacción. Alvaro (A) Díaz, doctor:

Conocimiento experto, comentario constructivo y redacción. Sergi (S) Hernández, máster: Recogida de datos y redacción. Anna (A) Solé-Ribalta, médico: Recogida de datos y redacción. Sebastià (S) González-Peris, médico: Recogida de datos y redacción. Conchita (C) Izquierdo, doctora: Conocimiento experto, comentario constructivo y redacción. Cristina (C) Esteva, doctora: Procesado de muestras de laboratorio y redacción. Gemma (G) Codina, doctora: Procesado de muestras de laboratorio y redacción. Ana María (AM) Planes, doctora: Procesado de muestras de laboratorio y redacción. Sonia (S) Uriona, médico: Procesado de muestras de laboratorio y redacción. Magda (M) Campins, doctora: Conocimiento experto, comentario constructivo y redacción. Pilar (P) Ciruela, doctora: Conocimiento experto, comentario constructivo y redacción. Luis (L) Salleras, doctor: Conocimiento experto, comentario constructivo y redacción. Ángela (Á) Domínguez, doctora: Conocimiento experto, comentario constructivo, redacción y recaudación de fondos. Carmen (C) Muñoz-Almagro, doctora: Diseño y metodología, conocimiento experto, comentario constructivo, procesado de muestras de laboratorio, redacción del manuscrito y recaudación de fondos. Juan José (JJ) García-García, doctor: Diseño y metodología, Conocimiento experto, comentario constructivo, redacción y recaudación de fondos.

Conflicto de intereses

La Dra. de Sevilla recibió becas del Instituto de Salud Carlos III y honorarios personales de Pfizer Inc. durante el período de estudio. El Dr. Moraga-Llop ha recibido honorarios de Pfizer Inc. fuera del estudio. La Dra. Campins recibió honorarios de Pfizer durante el período de estudio. La Dra. Muñoz-Almagro ha recibido becas de Pfizer, bioMérieux, Stat DX y el Instituto de Salud Carlos III y honorarios de Roche y GSK fuera del estudio. El Dr. García-García recibió becas del Instituto de Salud Carlos III y honorarios de Pfizer Inc. durante el período de estudio. El resto de los autores no tiene conflictos de interés que declarar.

Agradecimientos

A Roberto Chalela por su consejo en estadística.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.05.018>.

Bibliografía

1. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lamberts L, et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med*. 2009;6:e100008.
2. de Sevilla MF, García-García JJ, Esteva C, Moraga F, Hernández S, Selva L, et al. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:124-8.
3. Janoff EN. *Streptococcus pneumoniae*. En: *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica* (Mandell, Douglas y Bennett). Elsevier Inc.; 2016. p. 2434-53.
4. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374:893-902.
5. Rajaratnam JK, Marcus JR, Flaxman AD, Wang H, Levin-Rector A, Dwyer L, et al. Neonatal, postneonatal, childhood, and under-5 mortality for 187 countries, 1970-2010: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 4. *Lancet*. 2010;375:1988-2008.
6. World Health Organization. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age; 2008. Disponible en: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/
7. Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, 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.
8. González Martínez F, Navarro Gómez ML, Saavedra Lozano J, Santos Sebastián MM, Rodríguez Fernández R, González Sanchéz M, et al. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by non-vaccine serotypes in the era of the 7-valent conjugate vaccine. *An Pediatr (Barc)*. 2014;80:173-80.
9. Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, García-García JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008;15:174-82.
10. Domínguez A, Ciruela P, García-García JJ, Moraga F, de Sevilla MF, Selva L, et al. Effectiveness of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in the prevention of invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study. *Vaccine*. 2011;29:9020-5.
11. Domínguez Á, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Soldevila N, Izquierdo C, et al. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study. *PLoS One*. 2017;12:e0183191.
12. Moraga-Llop F, García-García JJ, Díaz-Conradi A, Ciruela P, Martínez-Orsorio J, González-Peris S, et al. Vaccine failures in patients properly vaccinated with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Catalonia, a region with low vaccination coverage. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35:460-3.
13. Hanquet G, Krizova P, Valentiner-Branth P, Ladhani SN, Nuorti JP, Lepoutre A, et al. Effect of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive disease in older adults of 10 European countries: implications for adult vaccination. *Thorax*. 2018;74:473-82.
14. Moreno-Pérez D, Alvarez García FJ, Arístegui Fernández J, Cilleruelo Ortega MJ, Corretger Rauet JM, García Sánchez N, et al. Immunization schedule of the Spanish Association of Paediatrics: 2014 recommendations. *An Pediatr (Barc)*. 2014;80:1-37.
15. Heining U, Bachtar NS, Bahri P, Dana A, Dodoo A, Gidudu J, et al. The concept of vaccination failure. *Vaccine*. 2012;30:1265-8.
16. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. 2000;106:362-6.
17. Muñoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarragó D, Pallares R. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:327-35.

18. Centers for Disease Control and Prevention. Chapter 10: PCR for Detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *S. pneumoniae*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html>.
19. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteve C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:828–34.
20. Selva L, Berger C, Garcia-Garcia JJ, de Paz H, Nadal D, Muñoz-Almagro C. Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2736–7.
21. Selva L, del Amo E, Brotons P, Muñoz-Almagro C. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3451–7.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25 (ISBN 1-56238-990-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.
23. Estadística Oficial de Catalunya. Institut d'Estadística de Catalunya. Disponible en: <http://www.idescat.net>
24. Sullivan KM, Dean A, Soe MM. OpenEpi: A Web-Based Epidemiologic and Statistical Calculator for Public Health. *Public Health Rep*. 2009;124:471–4.
25. Wiese AD, Griffin MR, Zhu Y, Mitchel EF, Grijalva CG. Changes in empyema among U.S. children in the pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine*. 2016;34:6243–9.
26. Muñoz-Almagro C, Selva L, Pallares R. Influence of pneumococcal vaccine on the incidence of empyema. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16:394–8.
27. Krenke K, Sadowy E, Podsiadly E, Hryniewicz W, Demkow U, Kulus M. Etiology of parapneumonic effusion and pleural empyema in children. The role of conventional and molecular microbiological tests. *Respir Med*. 2016;116:28–33.
28. Yildirim I, Shea KM, Little BA, Silverio AL, Pelton SI. Members of the Massachusetts Department of Public Health Vaccination, underlying comorbidities, and risk of invasive pneumococcal disease. *Pediatrics*. 2015;135:495–503.
29. Olarte L, Barson WJ, Barson RM, Romero JR, Bradley JS, Tan T, et al. Pneumococcal pneumonia requiring hospitalization in US children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis*. 2017;64:1699–704.
30. Novak D, Lundgren A, Westphal S, Valdimarsson S, Olsson ML, Trollfors B. Two cases of hemolytic uremic syndrome caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3, one being a vaccine failure. *Scand J Infect Dis*. 2013;45:411–4.
31. Poolman J, Kriz P, Feron C, Di-Paolo E, Henckaerts I, Miseur A, et al. Pneumococcal serotype 3 otitis media, limited effect of polysaccharide conjugate immunisation and strain characteristics. *Vaccine*. 2009;27:3213–22.