

BOLETÍN DE LABORATORIO Y VIGILANCIA AL DÍA

Vigilancia de laboratorio enfermedad invasora *Neisseria* *meningitidis* 2012-2016

BOLETÍN VOL.7 , NO. 2, FEBRERO 2017.

Vigilancia de laboratorio enfermedad invasora *Neisseria meningitidis* 2012-2016

1. ANTECEDENTES:

Neisseria meningitidis (Nm) pertenece a la Familia *Neisseriaceae*. Es un diplococo gramnegativo, no esporulado, inmóvil, encapsulado, en el microscopio se observa con forma de granos de café o arriñonada. Requiere para su crecimiento de un ambiente aeróbico con 5% CO₂ y medio de cultivo enriquecido con sangre. Las colonias desarrolladas en agar sangre o chocolate, después de 18 h de incubación a 35-37°C, son húmedas, transparentes, no pigmentadas, no hemolíticas, convexas y miden entre 0,5 a 1 mm de diámetro. Nm es oxidasa y catalasa positiva. Tiene al menos 12 serogrupos, de los cuales el A, B, C, W e Y son los más comúnmente identificados en casos de enfermedad invasora (1).

La enfermedad meningocócica invasora es una infección bacteriana grave, destacando la meningitis y la septicemia (meningococcemia), siendo esta última presentación particularmente frecuente y agresiva con la irrupción del serogrupo W.

La bacteria se transmite de persona a persona habitualmente a través de gotitas de Flügle. La propagación de la enfermedad se ve facilitada por el contacto estrecho y prolongado (besos, estornudos, tos, dormitorios colectivos, etc.) con una persona infectada. El periodo de incubación medio es de 4 días, pero puede oscilar entre 2 y 10 días.

Nm solo infecta al ser humano; no hay reservorios animales. La tasa de portadores en la población es variable, se han descrito trabajos que presentan tasas < 3% hasta 10 a 20%, aunque puede ser más elevada en situaciones epidémicas (2-4).

En Chile, el Instituto de Salud Pública, realizó un estudio sobre la portación faríngea de Nm, en el que se buscó determinar su prevalencia por serogrupo y genotipo. El estudio fue de corte transversal, entre abril y junio del 2013. Las muestras correspondieron a un total de 4.217 adolescentes sanos de entre 10 a 19 años. En el laboratorio de referencia se confirmó que 272 muestras correspondían a *Neisseria meningitidis*. Esto equivale a una prevalencia de 6.5% de portación de Nm en adolescentes (5).

Nm se clasifica de acuerdo al enfoque tradicional; por seroagrupación. Adicionalmente se realiza la identificación de serosubtipo, serotipo, e inmunotipo, que está basada en la estructura de PorA, PorB, y Lipooligosacáridos (LOS), respectivamente. La identificación de serogrupo se realiza por aglutinación en lámina o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que otra tipificación de meningococos es realizada usando anticuerpos monoclonales (mAbs), PCR y secuenciación de ADN.

La virulencia de Nm está determinada por múltiples factores: expresión de la cápsula polisacárida, expresión de las proteínas adhesivas a la superficie (proteínas de membrana externa incluyendo pili, porinas PorA y B, adhesión de moléculas Opa y Opc), mecanismos de captación de hierro y endotoxina (LOS) (6) Nm también ha desarrollado mecanismos genéticos que resultan en un intercambio genético horizontal, fase de alta frecuencia, variación antigénica y mimetismo molecular, permitiendo al organismo adaptarse con éxito a las superficies mucosas e invadir al huésped (7).

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas para Nm se realizan a través de las pruebas de concentración inhibitoria mínima (CIM) por las técnicas microdilución en caldo o epsilometría (6).

Hasta la fecha, la resistencia a los antibióticos, excepto las sulfonamidas, es relativamente poco frecuente en Nm. Sin embargo, se ha observado la aparición de cepas resistentes a ciprofloxacina, rifampicina y cloranfenicol. Además, la presencia de cepas con una resistencia intermedia a penicilina es relativamente frecuente y se debe mantener la vigilancia (8).

Las muestras que presentan cultivo negativo o que no se pueden cultivar, pueden ser analizadas por métodos moleculares extrayendo ADN de las muestras clínicas (habitualmente, sangre y LCR) (9).

Para la protección contra la enfermedad meningocócica, actualmente se encuentran disponibles seis vacunas con licencia de la FDA: tres conjugadas, una polisacárida y dos recombinantes. Sólo una vacuna meningocócica es combinada, además de los serogrupos meningocócicos C e Y, también proporciona protección contra enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (10).

Las vacunas antimeningocócicas del serogrupo B, no estuvieron disponibles hasta finales de 2014 (11).

Neisseria meningitidis, se cataloga como grupo 2 de Bioseguridad y, por lo tanto, debe ser manipulada en laboratorio de nivel 2. El laboratorio debe contar con una cabina de seguridad biológica de clase II diseñada para proteger al usuario y al ambiente de los riesgos asociados al manejo de este microorganismo (12).

Diagnóstico de Laboratorio

El Instituto de Salud Pública de Chile es el Laboratorio Nacional y de Referencia para Nm, y le corresponde, según Decreto Supremo de Notificación Obligatoria (D.S.) 158/2004, confirmar los aislamientos de Nm realizados por los laboratorios clínicos públicos y privados del país, y realizar vigilancia de la resistencia a antimicrobianos.

Para la confirmación de las cepas, se realiza una batería bioquímica en la que se observa la producción de ácido a partir de diferentes carbohidratos. Además, se determina el serogrupo mediante la técnica de aglutinación en lámina.

Para los casos sospechosos que presenten cultivos negativos, el Laboratorio de Referencia dispone de un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, para la búsqueda de material genético de patógenos meníngeos incluida Nm, utilizando como blanco el gen *ctrA*. A partir del año 2013 se realiza además identificación molecular de serogrupo por PCR en tiempo real de acuerdo al protocolo estandarizado por SIREVA-OPS.

Además, se vigila la susceptibilidad antimicrobiana a penicilina, ceftriaxona, cloranfenicol, rifampicina, ciprofloxacina y azitromicina mediante el método de concentración inhibitoria mínima (CIM) por epsilometría, y microdilución en caldo, según estándares CLSI vigentes (18). El Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública participa en la Red Latinoamericana SIREVA, amparada por la OPS, que se ha encargado de la estandarización y control de calidad de estas metodologías en nuestra región.

El Instituto realiza además la caracterización molecular de los aislamientos a través de técnicas moleculares de subtipificación como Secuenciación de Multilocus (MLST) que consiste en el análisis de fragmentos internos de siete genes constitutivos y la serosubtipificación mediante secuenciación de la proteína de superficie Por A, regiones 1, 2 y 3. Los resultados obtenidos son analizados en la base de datos internacional <http://pubmlst.org/neisseria/>.

2. MATERIAL Y MÉTODO:

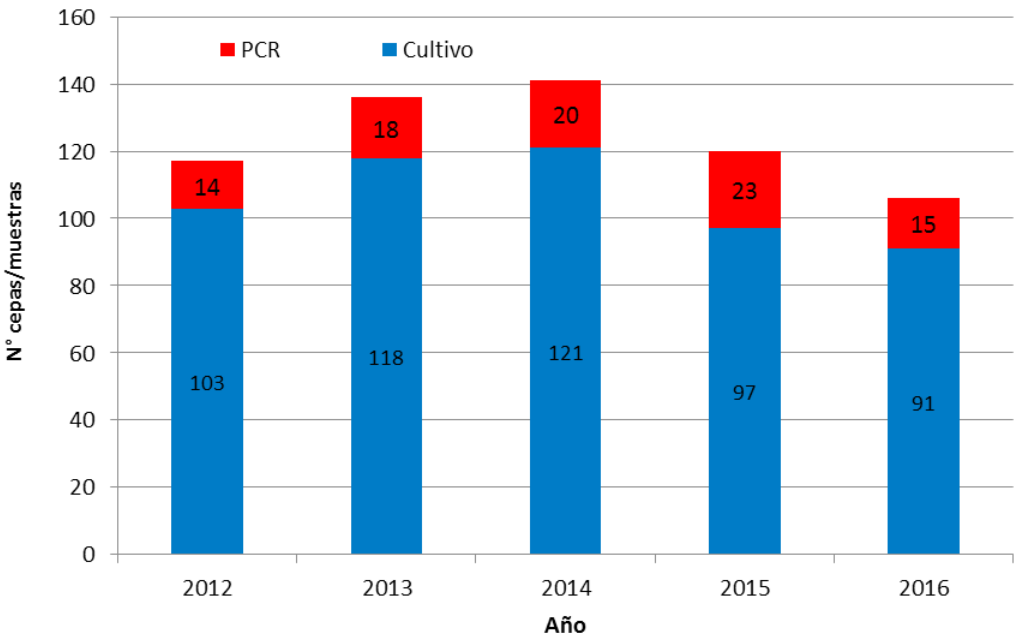
Los análisis se realizaron según fecha de obtención y procedencia de la cepa o muestra. Los datos se capturaron y procesaron en el paquete Excel 2010 y el software estadístico para el análisis de los datos, Stata 13. Para el análisis de las cepas o muestras de Nm se depuró la base de modo de asegurar que los análisis correspondan a casos de enfermedad meningocócica invasora (EMI) confirmados por laboratorio. Los resultados se representaron en tablas y gráficos para su mejor comprensión.

Resultados vigilancia de *Neisseria meningitidis* 2012– 2016.

Entre el año 2012 y el 2016, el Laboratorio de Referencia ha confirmado un total de 620 casos de enfermedad invasora por *N. meningitidis* (530 cepas y 90 muestras). De estos, el 85,5% (530/620) fueron confirmados mediante cultivo y el 14,5% (90/620) mediante el estudio de muestras por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT).

La Figura 1, indica el número de cepas y muestras confirmadas con *N. meningitidis* por año del periodo en estudio. En el año 2016 se confirmaron 106 casos, lo que representa una disminución del 24,8% respecto al año 2014, en el cual se registró el mayor número de casos confirmados (141).

Figura 1. Cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* según técnica de confirmación y año. Chile 2012-2016.



Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

Del total de casos confirmados por laboratorio en el periodo en estudio, el 53,2% (330/620) procedían de la Región Metropolitana, el 14,2% (88/620) de la Región de Valparaíso y el 6,9% (43/620) de Biobío. De los casos confirmados procedentes de Región Metropolitana, el 33% (109/330) provenían de laboratorios pertenecientes a los servicios de salud (Tabla 1).

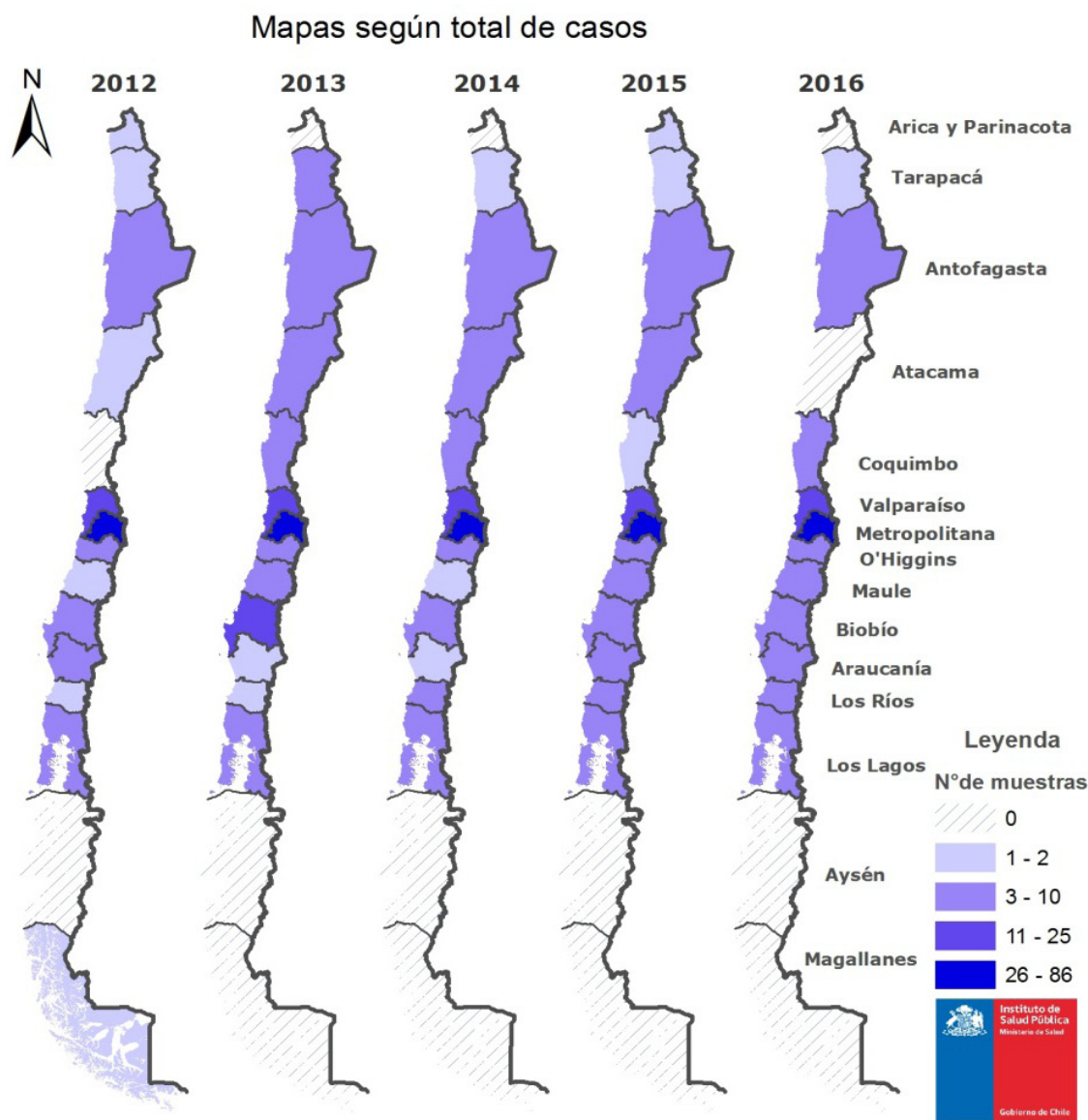
Tabla 1. Cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* según técnica de confirmación y procedencia. Chile 2012 -2016.

Región	Servicio de Salud	2012		2013		2014		2015		2016		Total	Total Región
		Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR		
Arica y Parinacota	Arica	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
	Privado	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Tarapacá	Iquique	1	0	1	0	0	1	2	0	1	0	6	8
	Privado	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
Antofagasta	Antofagasta	3	0	3	0	3	0	2	0	2	0	13	21
	Privado	0	0	1	1	1	1	2	0	1	0	7	
	Otros**	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
Atacama	Atacama	0	1	3	0	3	0	2	1	0	0	10	10
Coquimbo	Coquimbo	0	0	1	0	5	0	2	0	4	0	12	14
	Privado	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
Valparaíso	Aconcagua	0	2	4	0	2	0	7	0	3	0	18	98
	Valparaíso-San Antonio	14	0	4	2	4	0	2	1	5	1	33	
	Viña del Mar-Quillota	5	0	4	3	6	2	5	4	3	1	33	
	Privado	0	0	3	0	2	1	2	0	2	0	10	
	Otros**	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	4	
Metropolitana	Central	5	0	3	2	7	0	8	1	5	1	32	336
	Norte	5	0	7	1	5	0	5	0	5	0	28	
	Occidente	4	1	1	2	4	2	3	2	3	2	24	
	Oriente	6	2	10	1	4	0	4	1	4	2	34	
	Sur	8	1	7	0	13	2	7	3	1	2	44	
	Sur Oriente	12	0	11	1	13	5	4	0	3	0	49	
	Privado	18	0	21	1	26	2	15	6	18	2	109	
L. B. O'Higgins	Otros**	2	0	6	1	3	0	3	0	1	0	16	21
	L. B. O'Higgins	3	2	4	1	4	0	1	1	2	2	20	
Maule	Privado	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	13
	Maule	0	1	2	1	1	0	2	0	4	0	11	
Biobío	Privado	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	43
	Talcahuano	3	2	1	0	0	1	3	0	2	0	12	
	Ñuble	2	0	3	0	2	0	1	0	1	0	9	
	Concepción	1	0	2	1	1	0	2	0	4	0	11	
	Biobío	1	0	2	0	3	0	1	0	2	0	9	
Araucanía	Araucanía sur	2	0	2	0	1	0	3	0	3	1	12	14
	Araucanía norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Privado	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	
Los Ríos	Valdivia	1	1	0	0	5	1	2	2	4	1	17	18
	Privado	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
Los Lagos	Reloncaví	2	0	1	0	0	0	2	0	4	0	9	21
	Chiloé	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	Osorno	1	0	3	0	2	1	0	0	1	0	8	
	Privado	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	
Aysén	Aysén	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Magallanes	Magallanes	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total		103	14	118	18	121	20	97	23	91	15	620	

**Otros: Públicos no pertenecientes al Sistema Nacional de Servicios de Salud.
Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

La Figura 2 presenta el número de casos confirmados por laboratorio de enfermedad invasora por Nm por región de procedencia de la muestra o cepa y año. Se observa que en todo el periodo en estudio el mayor número de casos fueron confirmados a partir de cepas o muestras derivadas de laboratorios de la Región Metropolitana.

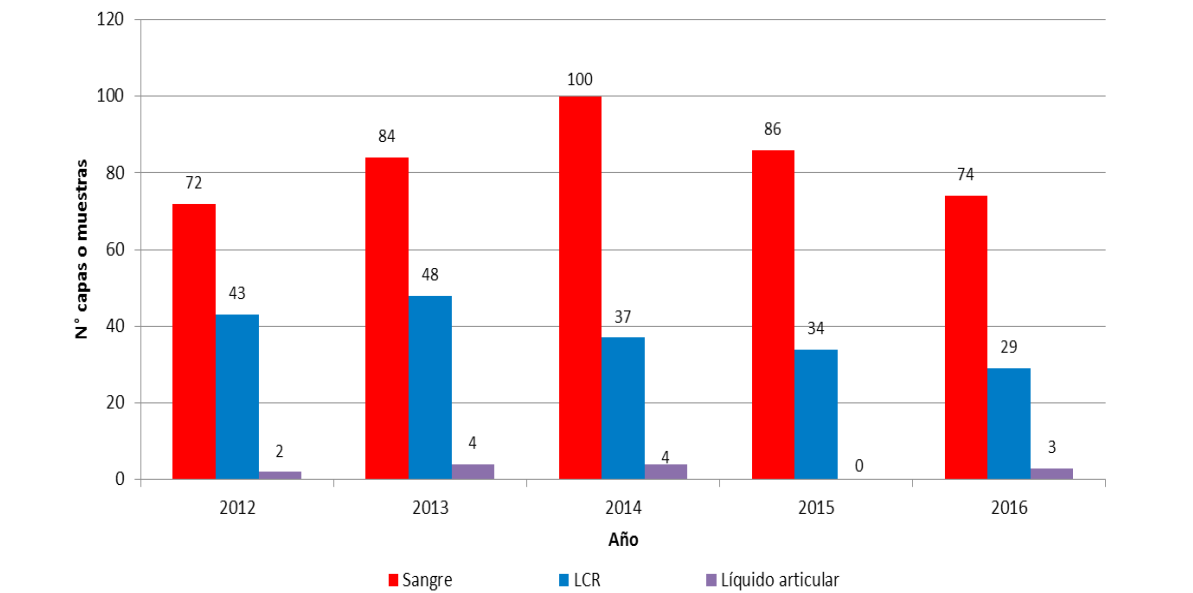
Figura 2.
Distribución de cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* según procedencia. Chile 2012-2016.



Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

En el periodo analizado el 67,1% (416/620) de los casos confirmados, la muestra de origen correspondió a sangre, el 30,8% (191/620) a muestras de líquido cefalorraquídeo y el 2,1% (13/620) a líquido articular (Figura 3).

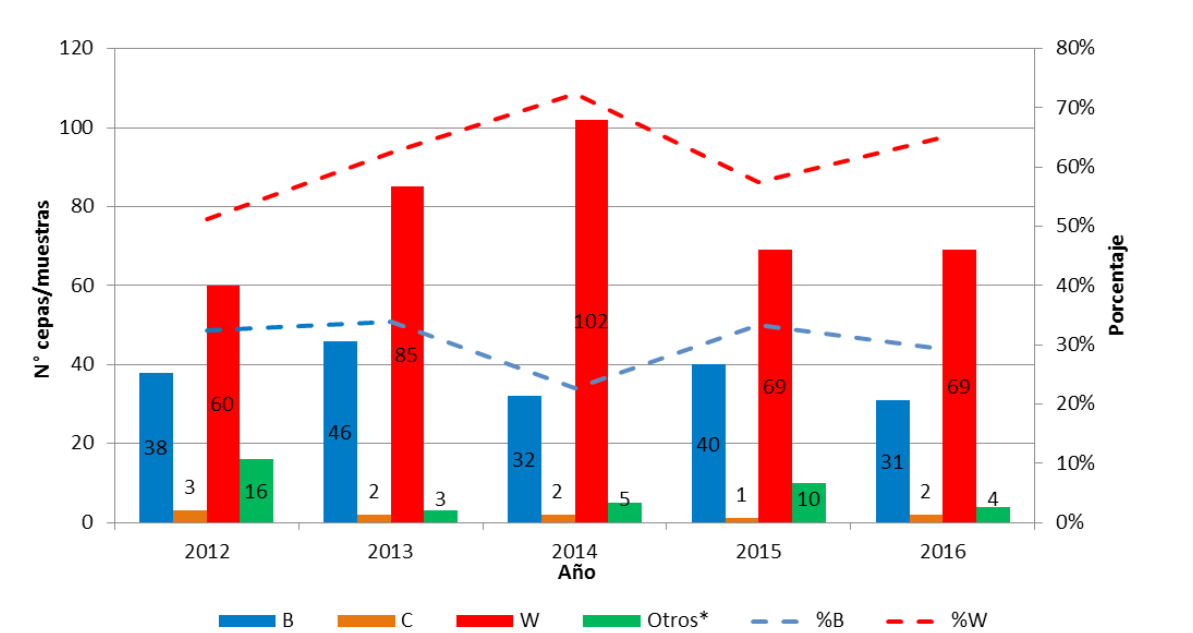
Figura 3. Cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* según tipo de muestra y año de confirmación. Chile 2012 - 2016.



Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

Con relación al total de cepas y muestras confirmadas, el serogrupo W fue prevalente en el periodo analizado, oscilando entre el 51,3% (60/117) en el año 2012 al 72,9% (102/140) en el 2014 (Figura 4).

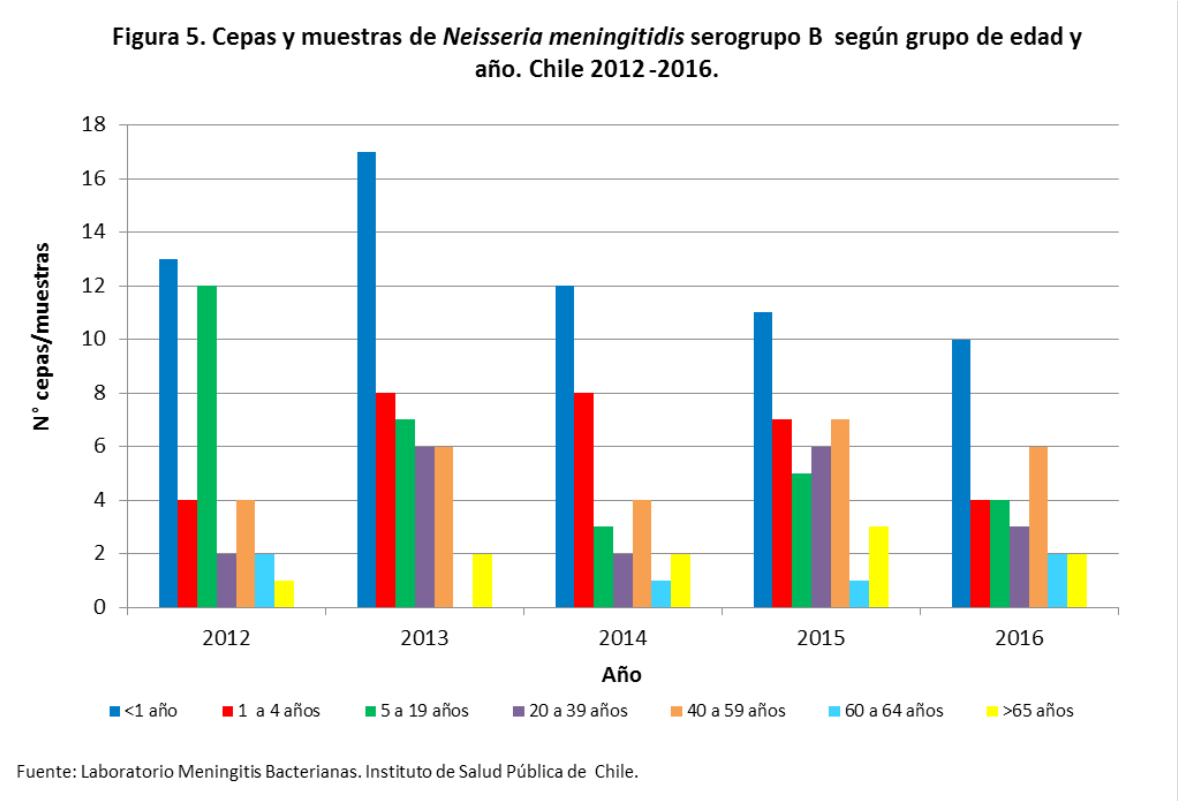
Figura 4. Cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* según serogrupo y año. Chile 2012-2016



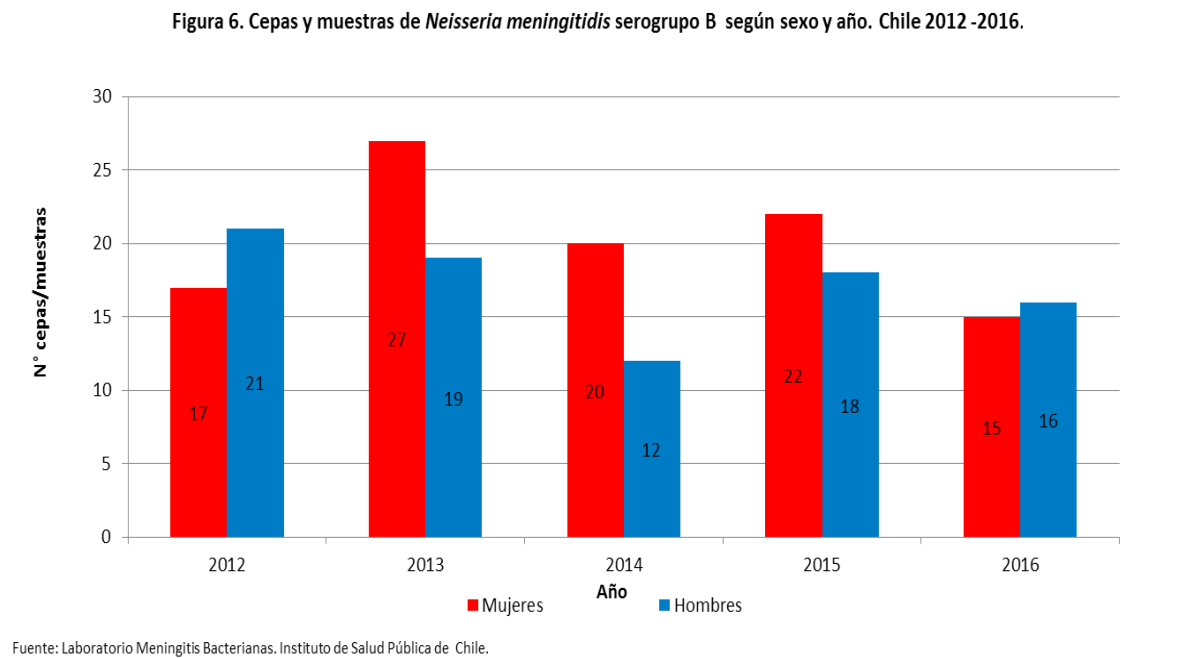
* Agrupa serogrupos Y, Z y no serotipificables.
Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

***N. meningitidis* serogrupo B**

Respecto a Nm serogrupo B, se observa predominio en el grupo de menores de 1 año, representando el 28,8% (63/219) respecto al total del periodo (Figura 5).

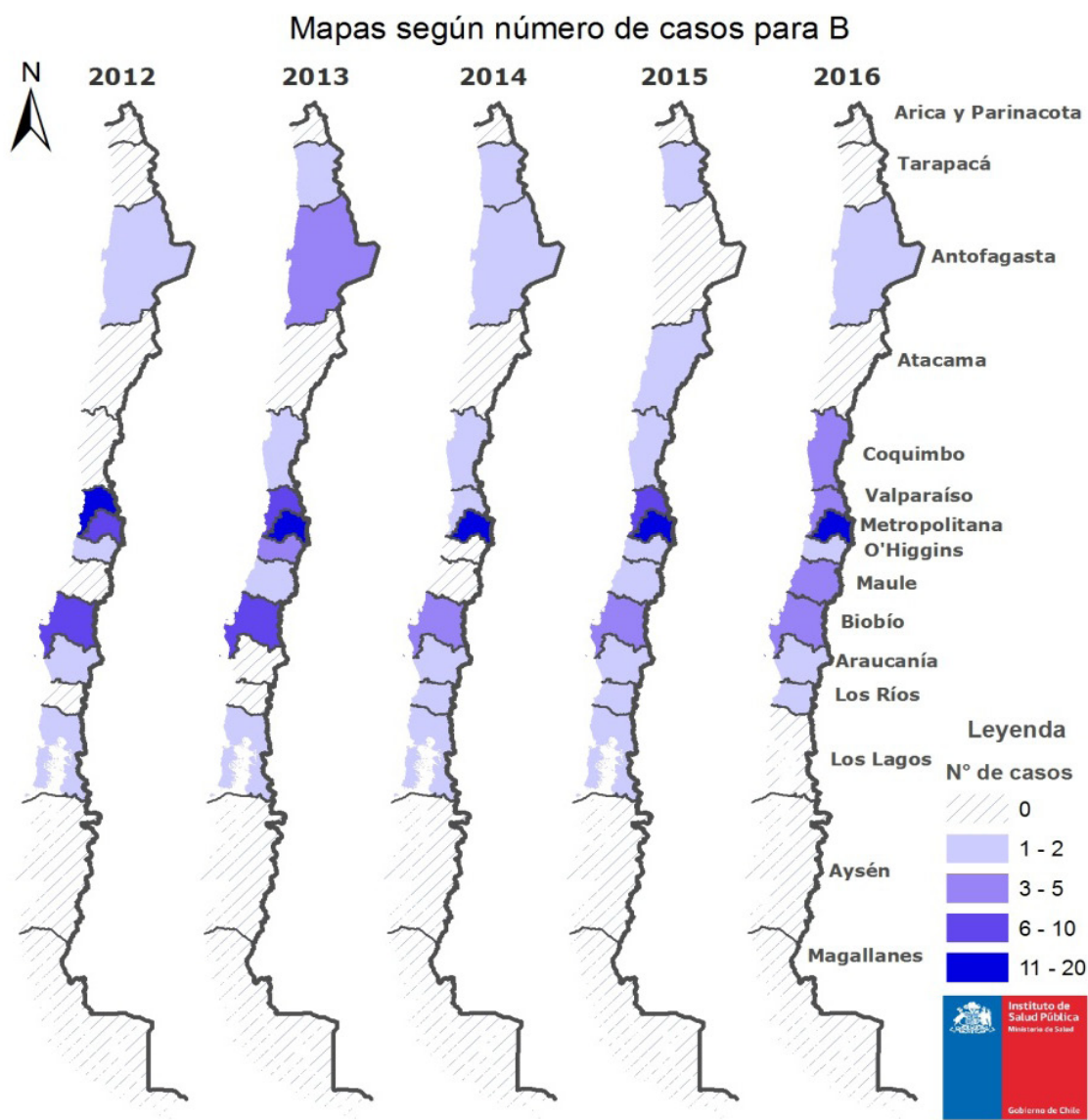


En el periodo analizado no se observan diferencias por sexo, sin embargo en el periodo 2013 a 2015 el mayor número de casos confirmados por laboratorio de *N. meningitidis* serogrupo B correspondió a mujeres , a diferencia de los años 2012 y 2016 (Figura 6).



La Figura 7 presenta el número de casos confirmados por laboratorio de *N. meningitidis* serogrupo B por región y año. El 44,5% (97/218) de las cepas y muestras confirmadas en el periodo de estudio proceden de la Región Metropolitana, seguida de la Región de Valparaíso con el 22,5% (49/218).

Figura 7.
Distribución de cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, según procedencia. Chile 2012-2016.

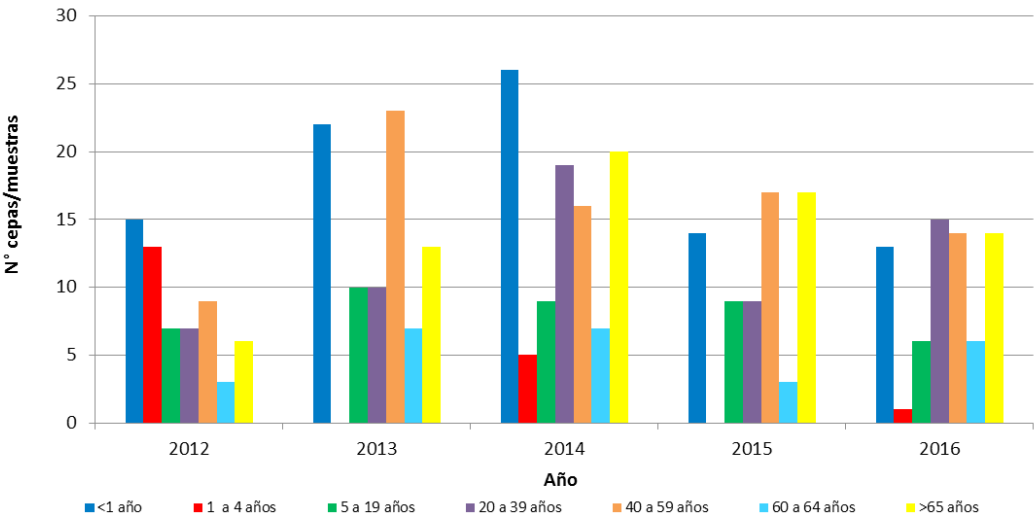


Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

***N. meningitidis* serogrupo W**

En la Figura 8 se observa que en los años 2012 y 2014 el mayor número de casos confirmados se registró en el grupo de menores de 1 año. Mientras que en los años 2013 y 2015, correspondió al grupo de 40 a 59 años y de 65 años y más.

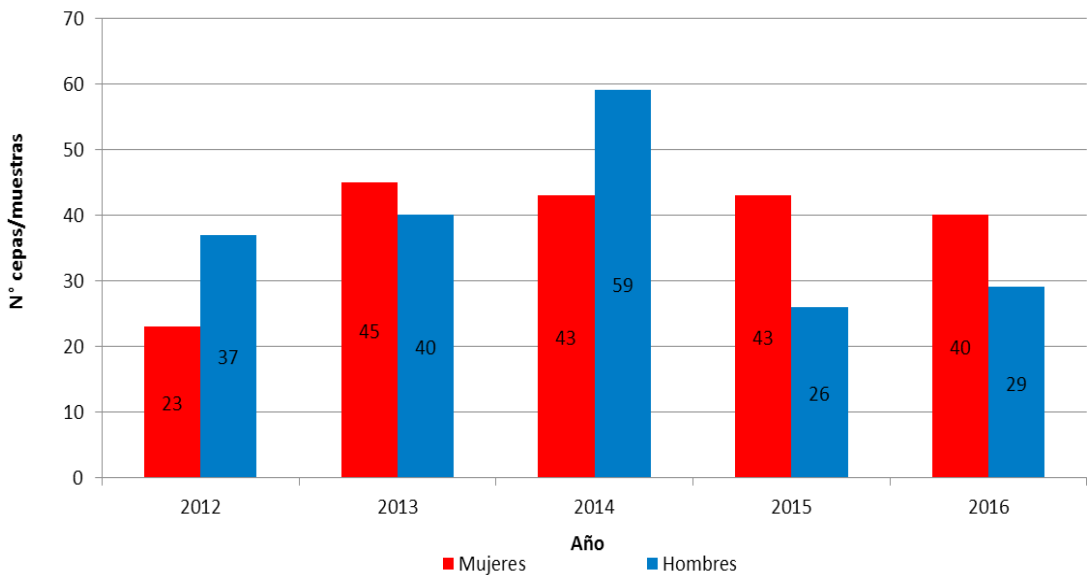
Figura 8. Cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* serogrupo W según grupo de edad y año. Chile 2011 -2015*



Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile. 2015.

La Figura 9 muestra el número de casos confirmados por laboratorio de Nm serogrupo W por sexo y año. El 57,4% (194/330) de casos confirmados del periodo corresponden a mujeres.

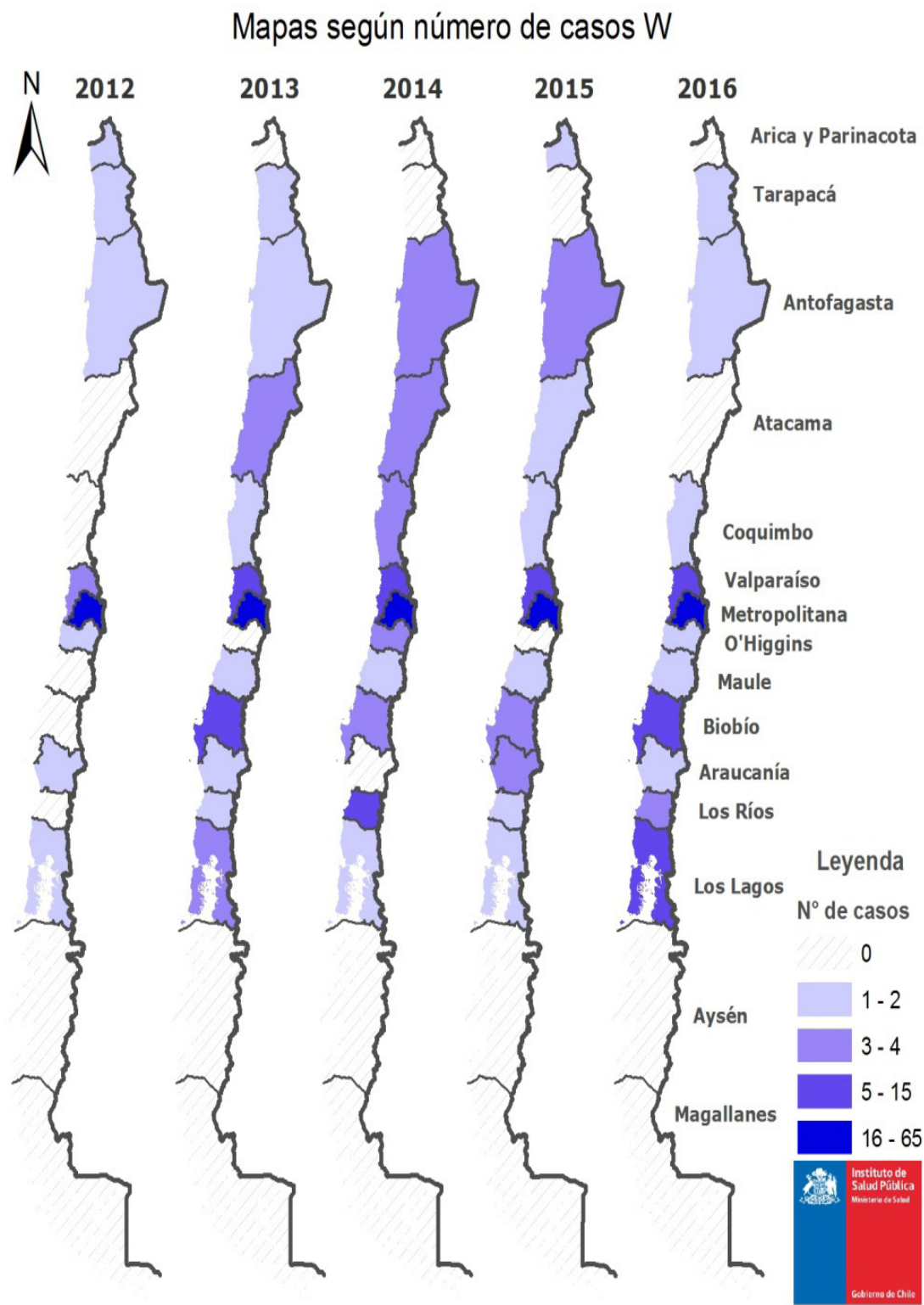
Figura 9. Cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* serogrupo W según sexo y año. Chile 2011 -2016.



Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile. .

La Figura 10 presenta el número de casos confirmados por laboratorio de *N. meningitidis* serogrupo W por región y año.

Figura 10.
Distribución de cepas y muestras de *Neisseria meningitidis* serogrupo W. Chile 2011-2016.



Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

Estudio de susceptibilidad antimicrobiana

La Tabla 4 presenta el número de cepas analizadas por año y el porcentaje de cepas sensibles intermedias y resistentes, para cada uno de los antimicrobianos estudiados.

El porcentaje de sensibilidad a penicilina varió entre 48% y 55%. El 100% de las cepas fueron sensibles a ceftriaxona, cloranfenicol, rifampicina y ciprofloxacino.

A partir del año 2015 se realiza el estudio de susceptibilidad a azitromicina, registrando el 100% de sensibilidad de las cepas estudiadas.

Tabla 4. Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas de *Neisseria meningitidis*.
Chile 2012 -2016.

Año	n	Penicilina		Ceftriaxona	Cloranfenicol	Rifampicina	Ciprofloxacino	Azitromicina
		S	I	S	S	S	S	S
2012	103	55%	45%	100%	100%	100%	100%	-
2013	118	51%	49%	100%	100%	100%	100%	-
2014	121	51%	49%	100%	100%	100%	100%	-
2015	97	48%	52%	100%	100%	100%	100%	100%
2016	91	55%	45%	100%	100%	100%	100%	100%

S: Sensible, I: Intermedio
Fuente: Laboratorio Meningitis Bacterianas. Instituto de Salud Pública de Chile.

Caracterización Molecular

El Subdepartamento de Genética Molecular del ISP, realizó la determinación del complejo clonal del 99,6% (528/530) de las cepas confirmadas en el periodo analizado y la determinación del serosubtipo del 99,8% (529/530) de ellas (Tabla 5).

Tabla 1: Número de cepas de *Neisseria meningitidis* con caracterización molecular
Chile 2012-2016

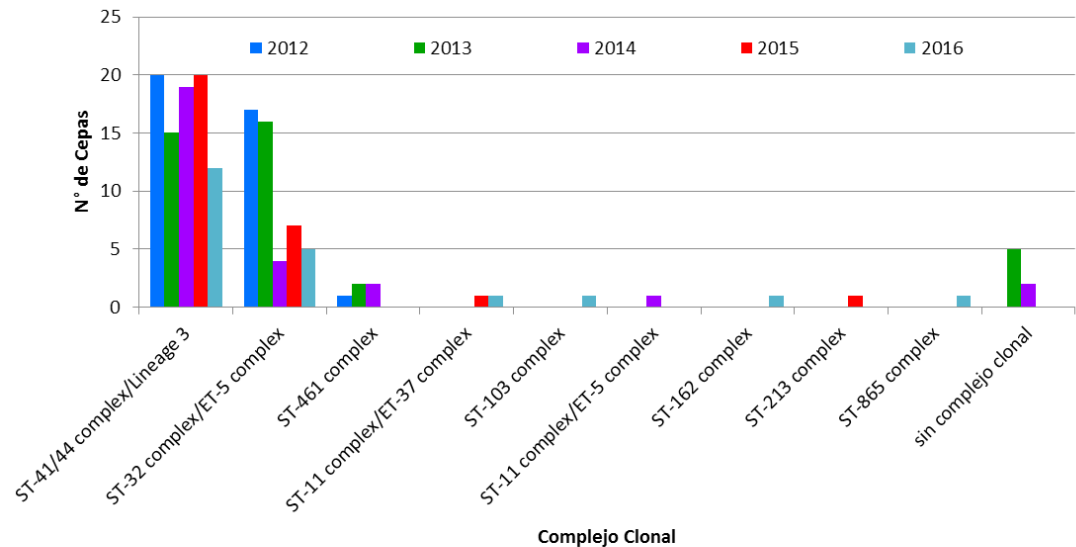
Año	N° de Cepas	Complejo Clonal	Serosubtipo
2012	103	103	103
2013	118	118	118
2014	121	121	121
2015	97	97	97
2016	91	89	90

Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular
Instituto de Salud Pública de Chile

***N. meningitidis* serogrupo B**

Los resultados del análisis por MLST para las cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, indican predominio del complejo clonal (CC) ST41/44 complex/lineage 3, seguido del ST 32 complex/ET-5complex, representando el 55,8 (86/154) y el 31,8(49/154) de las cepas estudiadas, respectivamente (Figura 11).

Figura 11: Distribución de complejos clonales de cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Chile 2012-2016.



Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública de Chile

El estudio de serosubtipo indica que el 47,7% (41/86) de las cepas pertenecientes al cc ST41/44 complex/lineage 3 corresponden al serosubtipo P1.19,13-1. El 81,6% (40/49) de las cepas del CC ST 32 complex/ET-5complex pertenecen al serosubtipo P1.7-2,3.

***N. meningitidis* serogrupo W**

La caracterización del serogrupo W revela que el 98,9% (350/354) de las cepas que cuentan resultado del estudio de complejo clonal, corresponden a ST-11 complex/ET-37 complex, de estas el 97,1% (340/350) corresponden al serosubtipo P1.5,2. Este complejo clonal es responsable de la amplia diseminación de este serogrupo en distintas regiones del mundo.

4. CONCLUSIONES:

El Laboratorio de Referencia de Meningitis Bacteriana ISP, en el periodo 2012-2016, ha confirmado microbiológicamente 620 casos de enfermedad invasora por *Neisseria meningitidis*. De estos, el 85,5% (530/620) correspondió a cepas confirmadas mediante cultivo y el 14,5% (90/620) a confirmación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

El 73,7% (457/620) del total de cepas y muestras confirmadas en el periodo 2012 a 2016 proceden de establecimientos públicos y el 22,9% (142/620) de establecimientos privados.

Durante el periodo analizado el serogrupo B se ha comportado relativamente estable.

El serogrupo W mostró una tendencia ascendente, en el periodo de 2012 a 2014, disminuyendo en el periodo 2015 y 2016. Los casos confirmados pertenecientes a este serogrupo fueron prevalentes en los menores de 1 año, no registrándose casos en el grupo de 1 a 4 años los años 2013 y 2015.

El 100% de las cepas estudiadas fueron sensibles para ceftiaxona, cloranfenicol, rifampicina, ciprofloxacino y azitromicina.

Los resultados del estudio de genética molecular indican el predominio, en las cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, del complejo clonal (CC) ST41/44 complex/lineage 3 serosubtipo P1. 19,13-1, seguido del ST 32 complex/ET-5complex, serosubtipo P1.7-2,3. Respecto a las cepas de *N. meningitidis* serogrupo W predomina el complejo clonal ST-11 complex/ET-37 complex, serosubtipo 5,2. Este complejo clonal esta ampliamente reportado y es responsable de la diseminación global de este serogrupo.

Destacamos el cumplimiento de la vigilancia de laboratorio para *Neisseria meningitidis* de parte de los laboratorios clínicos del país, factor fundamental para la elaboración de información de utilidad para la salud pública del país.

REFERENCIAS:

1. Government of Canada PHA of C. *Neisseria meningitidis* - Pathogen Safety Data Sheets [Internet]. 2011 [cited 2017 Mar 27]. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/neisseria-men-eng.php>
2. OMS Nota descriptiva N°141. Meningitis meningocócica [Internet]. WHO. 2015 [cited 2017 Mar 27]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/es/>
3. Martínez I, Sierra G, Pardo G, Álvarez N, Armesto M, Mirabal M. Portadores nasofaríngeos de *Neisseria meningitidis* en trabajadores con riesgo ocupacional. Vaccimonitor [Internet]. 2010 Apr [cited 2017 Mar 29];19(1):1–8. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1025-028X2010000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
4. OPS/OMS. Enfermedad Meningocócica: Información clave de apoyo para la confirmación y la respuesta para el manejo de eventos en América Latina y el Caribe [Internet]. 2011 [cited 2017 Mar 29]. Available from: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=17096&Itemid=270&lang=es
5. Instituto de Salud Pública de Chile. ISP realizó Estudio de Portación Faríngea *Neisseria meningitidis* sin precedentes en Chile [Internet]. 2013 [cited 2017 May 31]. Available from: <http://www.ispch.cl/noticia/19533>
6. Rouphael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology. Methods Mol Biol [Internet]. 2012 [cited 2017 Mar 24];799:1–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349422/>
7. Caugant D. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: importance for the epidemiology of meningococcal disease. Infection, Genetics and Evolution. 2008 Sep;8(5):558–65.
8. Dra. Ana Belén Ibarz: Diagnóstico de laboratorio de las Meningitis Bacterianas causadas por *Neisseria meningitidis* [Internet]. OPS; 2011 [cited 2017 Mar 23]. Available from: www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc
9. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Manual for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* [Internet]. [cited 2017 Mar 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/full-manual.pdf>
10. Comité Asesor de Vacunas Soc Española de Pediatría. MANUAL DE VACUNAS EN LÍNEA DE LA AEP [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 28]. Available from: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-30#12>
11. MedicinaPreventivaInfo. Vacuna contra Meningococo: MENACTRA®. Información del producto [Internet]. Medicina Preventiva Santa Fe. 2014 [cited 2017 May 9]. Available from: <http://medicinapreventiva.info/vacuna-contra-meningococo-menactra-informacion-del-producto/>
12. Organización Panamericana de la Salud. “Manual de bioseguridad para el procesamiento de muestras y cepas relacionadas con el diagnóstico de laboratorio de las neumonías y meningitis por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Una iniciativa de SIREVA II.” [Internet]. 2008 [cited 2017 Mar 24]. Available from: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/TH_manualBioseguridad.pdf