

# Distribución de serotipos y perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas en niños en Misiones, Argentina

Sandra Grenon<sup>a</sup>, Martha von Specht<sup>a</sup>, Alejandra Corso<sup>b</sup>, Julio Pace<sup>b</sup> y Mabel Regueira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Provincial de Pediatría de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. <sup>b</sup>Departamento de Antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas C. Malbrán. Misiones. Argentina.

**ANTECEDENTES.** El objetivo de este trabajo fue evaluar los patrones de resistencia antibiótica local y los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* implicados en enfermedades invasivas en pacientes pediátricos del Hospital Provincial de Pediatría de Misiones, Argentina.

**MÉTODOS.** Se estudiaron 101 cepas aisladas de niños a partir de muestras estériles, entre junio de 1998 y junio de 2001. Las muestras se procesaron por el método habitual, y los patrones de resistencia antibiótica se determinaron según pautas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), por técnicas de difusión y dilución. La serotipificación se efectuó mediante la reacción de Quellung.

**RESULTADOS.** El 62% de las neumonías, el 70% de las neumonías con derrame y de las meningitis y 78% de las sepsis correspondieron a niños menores de 2 años de edad (74% del total de pacientes).

Se identificaron 12 serotipos entre 71 cepas analizadas. Los tipos 14 (37,1%), 5 (21,4%), 1 (10%), 6A/6B (7,1%), 9N y 19A (5,7%) y 9V (4,3%) fueron los más frecuentes. Se observó sensibilidad disminuida a penicilina en el 39% de los aislamientos, el 17,5% de los cuales presentó resistencia intermedia y el 21,5% alto nivel de resistencia. Para ningún aislamiento la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue superior a 4 µg/ml. La resistencia a penicilina quedó circunscrita a cinco serotipos, correspondiendo en el 84% de los casos al 14. Entre 71 aislamientos en que se efectuó la CIM a cefotaxima, 50 presentaron un valor menor o igual a 0,5 µg/ml; 18 una CIM de 1 µg/ml y tres de 2 µg/ml. No se detectaron cepas cuya CIM fuera superior a 2 µg/ml. El 22% de los aislamientos fue resistente a tetraciclina, el 48% a trimetoprima-sulfametoxazol, el 11% a cloranfenicol y el 6,8% a eritromicina. Ningún aislamiento fue resistente a vancomicina, ofloxacino ni rifampicina. Los patrones de resistencia combinada más comunes,

entre las cepas no sensibles a penicilina, fueron: penicilina-trimetoprima-sulfametoxazol (20%) seguido de penicilina-cefotaxima-trimetoprima-sulfametoxazol (7%; 3 aislamientos con CIM a cefotaxima = 2 µg/ml) y penicilina-trimetoprima-sulfametoxazol-cloranfenicol (5%).

**CONCLUSIONES.** Los patrones de resistencia y los tipos capsulares circulantes locales observados en este trabajo permiten adecuar esquemas terapéuticos a nuestra realidad y brindan información al equipo médico para evaluar el uso de vacunas como herramienta de prevención y control de las infecciones invasivas por *S. pneumoniae*.

**Palabras clave:** *Streptococcus pneumoniae*. Resistencia antibiótica. Infección pediátrica. Serotipos.

Distribution of serotypes and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children in Misiones, Argentina

**BACKGROUND.** The aim of this study was to assess the local resistance patterns and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* implicated in invasive infections in children in Hospital Provincial de Pediatría in Misiones, Argentina.

**METHODS.** A total of 101 strains isolated from sterile sites between June 1998 and June 2001 were studied. Strains were identified according to standard methods. Resistance patterns were determined by disk diffusion and a macrodilution method according to NCCLS guidelines. Capsular typing was based on the Quellung technique.

**RESULTS.** Among the total, 62% of pneumonia cases, 70% of pneumonia with pleural effusion and meningitis, and 78% of sepsis occurred in children younger than 2 years old (74% of the total).

Twelve serotypes were detected among 71 strains analyzed. Types 14 (37.1%), 5 (21.4%), 1 (10%), 6A/6B (7.1%), 9N and 19A (5.7%) and 9V (4.3%), were the most frequent.

Penicillin (PEN) resistance was detected in 39% of isolates: 17.5% had intermediate levels and 21.5% high levels

Correspondencia: Dra. M. von Specht.  
Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales.  
Universidad Nacional de Misiones.  
Avda. Mariano Moreno, 110. 3300 Posadas. Argentina.  
Correo electrónico: marthatovs@yahoo.com.ar

Manuscrito recibido el 17-7-2003; aceptado el 15-3-2004.

of resistance. None of the strains had PEN MICs of  $> 4 \mu\text{g/ml}$ . PEN resistance was limited to 5 serotypes, with 84% corresponding to type 14. Among the 71 strains, in 50 CTX MICs were  $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ , in 18 the MIC was  $1 \mu\text{g/ml}$  and in 3 the MIC was  $2 \mu\text{g/ml}$ . None of the strains had CTX MICs of  $> 2 \mu\text{g/ml}$ . Twenty-two percent of strains were resistant to tetracycline, 48% to trimethoprim-sulfamethoxazole (TMS), 11% to chloramphenicol (CLO) and 6.8% to erythromycin. None of the isolates were resistant to vancomycin, ofloxacin or rifampin. The most common combined resistance patterns were PEN-TMS (20%), PEN-CTX-TMS (7%, 3 strains with a CTX MIC of  $2 \mu\text{g/ml}$ ) and PEN-TMS-CLO (5%).

**CONCLUSIONS.** The local drug resistance patterns and serotype distribution defined in this study allow appropriate empirical therapy to be established in our area and provide information that can be used assess vaccination strategies as a preventive tool for the control of invasive pneumococcal infections.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*. Antibiotic resistance. Invasive infections in pediatrics. Serotypes.

## Introducción

*Streptococcus pneumoniae* es una de las causas más comunes de infección bacteriana invasiva en niños y de mayor morbimortalidad en todo el mundo, en especial en los países en desarrollo. Es el agente etiológico más frecuente en neumonía extrahospitalaria y una causa importante de meningitis, bacteriemia con o sin endocarditis, sinusitis y otitis media aguda<sup>1-4</sup>.

En Argentina los serotipos 14, 5, 1, 6A/6B, 7F, 9V, 19F, 19A, 16F y 23F constituyen los más frecuentes entre las cepas que circulan en la población de niños menores de 6 años<sup>3</sup>.

Si bien desde su introducción, la penicilina ha constituido el tratamiento empírico de elección para estas infecciones, su resistencia se ha diseminado rápidamente a través del mundo en la década de 1980, principalmente en Sudáfrica<sup>4</sup>, España<sup>5</sup>, Hungría<sup>6</sup>, Checoslovaquia<sup>7,8</sup>, Asia<sup>9</sup>, Estados Unidos<sup>10,11</sup>, Australia<sup>12</sup> y otros países de Europa<sup>13-15</sup>. Argentina, que por esa época presentaba, según informes parciales, un 15% de aislamientos con sensibilidad disminuida a penicilina, comunicó hacia mediados de 1990 un incremento a más del 30%<sup>16</sup>.

Los datos de los que se disponen en Argentina, como los de otros países, indican que las infecciones por neumococos resistentes constituyen un problema creciente, que exige la implementación de medidas de control como la inmunización activa a grupos de riesgo en los que la vacuna tenga eficacia reconocida y sobre todo una racional utilización de los antibióticos<sup>4,17-19</sup>.

Este trabajo tuvo por finalidad establecer los serotipos predominantes de *S. pneumoniae* aislados de procesos invasivos en nuestra región y determinar el perfil de sensibilidad a distintos antimicrobianos para establecer pautas

de tratamiento empírico en el Hospital de Pediatría de Misiones y evaluar la probable eficacia del uso de las vacunas conjugadas en esta población.

## Métodos

El Hospital Provincial de Pediatría de Misiones (HPPM; Posadas, Argentina), actúa como centro de referencia en la región. Cuenta con 100 camas, y recibe derivaciones de otras localidades de Misiones, como también del norte de la provincia de Corrientes, y del sur de la República de Paraguay.

Se estudiaron cepas de *S. pneumoniae* aisladas de procesos invasivos de 101 pacientes pediátricos ( $> 1$  mes y  $< 14$  años) que fueron ingresados por diferentes procesos en el HPPM durante el período comprendido entre el 1 de junio de 1998 y el 30 de junio de 2001. La población fue clasificada en lactantes ( $< 2$  años), preescolares ( $> 2-4$  años) y escolares ( $> 5$  años).

Las cepas estudiadas, consecutivas y no relacionadas, fueron aisladas de los siguientes materiales: líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, hemocultivos, líquido ascítico y otros líquidos estériles. Las muestras se inocularon en placas de agar sangre de carnero al 5% (base Tripticasa Soja: Britania S.A., Buenos Aires, Argentina), agar chocolate (base Columbia, Britania), caldo tioglicolato (Britania) y caldo sangre de carnero al 5% (base caldo tripteína Soya, Britania). La incubación se efectuó en atmósfera de 5% de dióxido de carbono, a  $35^\circ\text{C}$  durante 24-48 h. Se evaluaron las colonias con morfología característica, y se identificaron como neumococo por medio de la sensibilidad con el disco de optoquina (Britania) y la solubilidad en sales biliares (Merck, Darmstadt, Alemania)<sup>2,18</sup>.

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se efectuaron por los métodos de difusión con discos y de macrodilución en caldo, siguiendo las pautas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>20</sup>.

Por método de difusión se ensayaron rifampicina (5  $\mu\text{g}$ ), oxacilina (1  $\mu\text{g}$ ), eritromicina (15  $\mu\text{g}$ ), cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ), vancomicina (30  $\mu\text{g}$ ), trimetoprima-sulfametoxazol (1,25/23,75  $\mu\text{g}$ ), ofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ) y tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ), utilizándose monodiscos de Lab. Britania, Buenos Aires, Argentina; y por el método de macrodilución, penicilina (*Richet*, Buenos Aires, Argentina) y cefotaxima (Argentina, laboratorios Bristol-Myers Squibb, Buenos Aires, Argentina).

El control de calidad de ambos métodos se realizó utilizando la cepa de referencia *S. pneumoniae* ATCC 49619<sup>20</sup>.

Las cepas se enviaron al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI-ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, para su confirmación de especie y determinación de serotipo y factor. El serotipo se determinó por la técnica de Quellung, utilizando antisueros específicos producidos por el Statens Seruminstitut (Copenhague, Dinamarca).

La conservación de los microorganismos se realizó mediante suspensión en leche descremada al 10%, a  $-20^\circ\text{C}$ .

Se utilizó el programa Epi-info versión 6 para la recogida de los datos de cada paciente, así como para evaluar los resultados obtenidos por el laboratorio. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Las 101 cepas de *S. pneumoniae* fueron aisladas de: LCR (16,8%); líquido pleural (31,7%); hemocultivos (47,5%), y otras muestras (líquido ascítico, punción de hematoma, líquido pericárdico, punción de válvula hidrocefálica, 3,9%). Los diagnósticos correspondieron a: meningitis, 17 (16,8%); neumonía con o sin derrame, 66 (65,3%); sepsis, 9 (8,9%), y otros (artritis, pericarditis, peritonitis, fiebre de origen desconocido, hidrocefalia), 9 (8,9%). El 74% de los niños eran lactantes; el 17%, preescolares, y el 9%, escolares. El 62% de las neumonías, el 70% de las neumonías con derra-

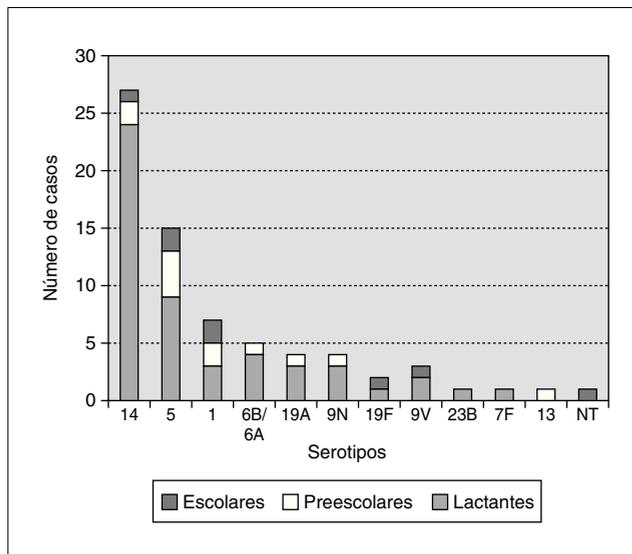


Figura 1. Distribución de serotipos de *S. pneumoniae* aislados de infecciones invasivas (n = 71) según grupos de edad.

me, el 70% de las meningitis y el 78% de las sepsis se diagnosticaron en niños menores de 2 años de edad.

De los 101 aislamientos, se enviaron 71 para serotipificar, detectándose 12 serotipos diferentes. Una cepa resultó no tipificable. La frecuencia de los mismos y la distribución por grupos de edad se muestran en la figura 1. Para los propósitos de este estudio, los serotipos 6A y 6B se evaluaron juntos (6A/6B). El serotipo 14 fue el detectado con más frecuencia entre los lactantes, mientras que los serotipos 5, 14 y 1, sin diferencias significativas, fueron los prevalentes entre los niños mayores. No se observó asociación entre diagnósticos de meningitis o neumonía y serotipo aislado.

La resistencia a penicilina se detectó en el 39% de los 101 aislamientos, quedando circunscrita a cinco serotipos. El 84% de la misma correspondió al serotipo 14. Se detectaron niveles intermedios de resistencia en el 17,5% de los casos (18 cepas) y altos niveles en el 21,5% (22 cepas). Para ningún aislamiento la CIM a PEN fue superior a 4 µg/ml (tablas 1 y 2).

Se observó mayor resistencia en los aislamientos de niños menores de 2 años (42%, 32 niños) respecto a la de los otros grupos de edad (29%, 8 niños), sin detectarse diferencias significativas. La edad promedio de los pacientes con cepas resistentes a penicilina fue de 1,8 ± 0,3 años, y la de los niños con cepas sensibles a penicilina fue 2,6 ± 0,5 años. Del total de pacientes en los que se aisló *S. pneumoniae* resistente a penicilina, en el 67% el diagnóstico fue neumonía (27/40), mientras que en el 10% fue meningitis (4/40).

De los 71 aislamientos en los cuales se efectuó CIM a cefotaxima, 50 presentaron un valor igual o menor a 0,5 µg/ml; 18 cepas, 1 µg/ml, y 3 cepas, 2 µg/ml. No se detectaron valores de CIM superiores.

Entre las 10 cepas aisladas de cuadros meníngeos, ocho fueron sensibles y dos presentaron CIM a cefotaxima de 1 µg/ml. Éstas correspondieron al serotipo 14 y se aislaron de lactantes.

De los 61 aislamientos extrameníngeos, 58 fueron sensibles a cefotaxima y 3 cepas presentaron CIM de 2 µg/ml.

TABLA 1. Distribución de los serotipos y perfiles de resistencia a penicilina de *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas (n = 71)

Serotipo	Total casos	Frecuencia (%)	Resistencia (n.º [%])		
			S	I	R
14	27	37,1	5 (19)	6 (22)	15 (59)
5	15	21,4	15 (100)	0	0
1	7	10	7 (100)	0	0
6B/6A	5	7,1	4 (80)	1 (20)	0
9N	4	5,7	4 (100)	0	0
19A	4	5,7	3 (75)	1 (25)	0
19F	2	2,9	2 (100)	0	0
9V	3	4,3	2 (66)	1 (33)	0
23B	1	1,4	0	1 (100)	0
7F	1	1,4	1 (100)	0	0
13	1	1,4	1 (100)	0	0
NT	1	1,4	1 (100)	0	0

S: sensible; I: intermedio; R: alta resistencia.

TABLA 2. *Streptococcus pneumoniae*, resistencia a penicilina detectada entre los diferentes diagnósticos (n = 101)

Diagnósticos	Total de casos	Cepas intermedias (%)	Cepas resistentes (%)
Neumonía	66	7 (10,6)	20 (30,3)
Meningitis	17	4 (23,5)	0
Sepsis	9	4 (44,4)	0
Otros	9	3 (33,3)	2 (22)

Estas 3 cepas, clasificadas con resistencia intermedia, pertenecieron al serotipo 14 y se aislaron de pacientes lactantes con cuadros de neumonía.

No se aislaron cepas sensibles a penicilina que fueran resistentes a cefotaxima.

Sobre 101 cepas ensayadas, se observaron los siguientes perfiles de resistencia: eritromicina (6,8%); cloranfenicol, (11%); trimetoprima-sulfametoxazol (48%); tetraciclina (22%); no se detectó resistencia a vancomicina, rifampicina y ofloxacino.

El 48% de los neumococos tuvo resistencia al menos a uno de los antimicrobianos probados. Del total de las cepas resistentes a penicilina, el 51% lo fue a más de un antibiótico y el 33% de éstas fue multiresistente, comprometiendo a tres o más compuestos. Una cepa presentó resistencia a cinco antimicrobianos de los nueve estudiados (penicilina, cefotaxima, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina y cloranfenicol).

Entre las cepas no sensibles a penicilina, el patrón de resistencia combinada más frecuente fue penicilina, trimetoprima-sulfametoxazol (8 aislamientos, 20%) seguido de penicilina-cefotaxima-trimetoprima-sulfametoxazol (7%, 3 aislamientos con CIM a cefotaxima = 2 µg/ml) y penicilina-trimetoprima-sulfametoxazol,-CMP (2 aislamientos, 5%).

## Discusión

Se han publicado numerosos estudios sobre la distribución de tipos capsulares de neumococos provenientes de procesos invasivos, que demuestran las variaciones en diferentes zonas geográficas. Los datos actualizados en Ar-

gentina pueden no reflejar la realidad de nuestra área, considerando la irregular distribución de la población en el país<sup>21-25</sup>. La provincia de Misiones se encuentra ubicada en el extremo noreste de la república, con una extensión de 29.801 km<sup>2</sup> y 961.000 habitantes, y no presenta centros de gran densidad poblacional.

El serotipo 14, con una frecuencia del 38% en este trabajo, es el de mayor predominio en nuestro país y, salvo algunas diferencias regionales, también en Brasil y Uruguay<sup>3,24,26</sup>. Este serotipo está ampliamente distribuido en el mundo entero, siendo (con algunas excepciones como España o Pakistán) uno de los más prevalentes. Los tipos 1 y 5, que casi no se aíslan en Estados Unidos y España, ocupan el segundo y tercer lugar entre los niños de Argentina, al igual que en este estudio, seguidos en orden de importancia por los serotipos 6A/6B.<sup>3,5,10,11</sup>

Ningún aislamiento correspondió al serotipo 23F. Éste, usualmente asociado con resistencia a penicilina, es frecuente en países como México o Colombia, pero es infrecuente entre los niños de Argentina y el cono sur de América Latina<sup>3,16,26</sup>.

En este trabajo y en coincidencia con autores argentinos observamos diferencias significativas entre los tipos capsulares detectados en los lactantes y los niños mayores<sup>3</sup>. En concordancia con investigadores brasileños<sup>24</sup> y argentinos<sup>3</sup>, entre los lactantes predominó el serotipo 14. Sin embargo, en los niños mayores no se detectaron variaciones significativas entre los serotipos 5, 14 y 1.

Según esta información epidemiológica, la vacuna hepavalente disponible en el mercado tendría una cobertura teórica frente al 60% de los serotipos causantes de enfermedad invasiva en niños menores de 2 años de edad en nuestro medio.

Entre 1993 y 1998 varios grupos de trabajo latinoamericanos han publicado datos sobre la variación de los niveles de resistencia a penicilina en cepas de neumococos causantes de enfermedad invasora en población pediátrica<sup>26,27</sup>. En 1998 la resistencia global a este antimicrobiano alcanza un 34,2%, que oscila entre el 22,3% en Brasil al 49,4% en México. En este período, se publicó en Argentina un incremento del 22 al 45%<sup>21</sup>.

Los perfiles detectados en este estudio resultan similares a los de otros autores del país<sup>21,27</sup> y extranjeros<sup>6,12,26</sup>. La resistencia de bajo nivel (categoría clínica de intermedio) a cefotaxima cercana al 4% entre los cuadros extrameningeos es inferior a la publicada para toda la Argentina<sup>21</sup>. En nuestro hospital, la incidencia de este perfil entre aislamientos de pacientes con diagnóstico meningitis, y al igual que en otros centros pediátricos nacionales<sup>27</sup>, sigue siendo baja. Se ha observado una marcada asociación entre resistencia a penicilina y a cefalosporinas de tercera generación en todo el mundo<sup>28,29</sup>. Nuestros hallazgos refrendan esos resultados. No se ha observado ninguna cepa con resistencia, en sentido estricto, a cefotaxima.

Las primeras cepas de neumococo con resistencia múltiple se encontraron en la población pediátrica. Desde entonces, se ha observado que éstas son más comunes en niños que en adultos. La razón de esta asociación no está clara, pero probablemente refleje el amplio uso de antibióticos<sup>16,17</sup>.

En cuanto a los antimicrobianos no betalactámicos, los niveles de resistencia a eritromicina, trimetoprima-sulfa-

metoxazol y rifampicina resultaron similares a los comunicados para el país, siendo nuestros hallazgos mayores para cloranfenicol y tetraciclina<sup>21</sup>.

Si bien se han informado aislamientos resistentes a fluoroquinolonas<sup>30</sup>, no se han detectado cepas resistentes a ofloxacino en este trabajo.

Al igual que lo observado por Culasso et al<sup>27</sup> del Hospital de Niños de Córdoba (Argentina)<sup>27</sup>, el patrón de resistencia combinada más frecuente encontrado entre las cepas no sensibles a penicilina en este estudio, fue penicilina-trimetoprima-sulfametoxazol (20%), seguido de penicilina-trimetoprima-sulfametoxazol-cefotaxima (7%), si bien ninguna de las 3 cepas presentó resistencia estricta a cefotaxima.

Con este estudio se ponen en evidencia los perfiles de resistencia de nuestra zona, llevando a la necesidad de adecuar los esquemas terapéuticos a la realidad local, que mediante el uso racional de los antibióticos permitirá frenar el aumento alarmante de cepas resistentes a diversos fármacos.

Además de la falta de recursos en los hospitales que impide la toma de hemocultivos en todos los pacientes que llegan con síntomas de neumonía o meningitis, los problemas en el aislamiento, cultivo e identificación de *S. pneumoniae* contribuyen a la falta de información y a la poca recuperación de esta bacteria. El empleo indiscriminado de antimicrobianos y la falta de un control de calidad estricto en los medios de cultivo favorecen aún más una recuperación pobre y, por lo tanto, un estudio muy limitado de la sensibilidad antimicrobiana. Los pocos fármacos para tratar el creciente número de cepas multiresistentes, la frecuencia de infecciones respiratorias y meningitis causadas por los neumococos en niños, sanos, la presencia y gravedad de estas infecciones en recién nacidos, adultos y pacientes inmunodeprimidos, así como el aumento en la prevalencia de esta bacteria, hace que el desarrollo de una vacuna efectiva sea una prioridad.

## Agradecimientos

Este estudio se ha realizado con la colaboración del personal del laboratorio de bacteriología del Hospital Provincial de Pediatría de Misiones: Bqco. Marcelo Salvi, Ramón Castillo, Elida Horodeski, Gustavo Maciel, Delia Villalba y de la División Bacteriología clínica del INEI ANLIS Dr. Carlos G. Malbran: Elsa Chávez y Cristina Correa. Agradecemos a la Prof. Mary M. Kuhlmann su asesoramiento en la traducción al inglés.

## Bibliografía

- Liñares L, Gracia D, Alonso T. *Streptococcus pneumoniae*: desarrollo de resistencia a los antibióticos en España. *Infect Microbiol Clin* 1989;1:53-8.
- Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*, p. 283-296. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington: ASM Press, 1999.
- Rossi A, Ruvinsky R, Regueira M, Corso A, Pace J, Gentile A, et al. Distribution of capsular types and penicillin-resistance of strains of *Streptococcus pneumoniae* causing systemic infections in Argentinian children under 5 years of age: *Streptococcus pneumoniae* Working Group. *Microb Drug Resist* 1997;3:135-40.
- Smith AM, Klugman KP. Three predominant clones identified within penicillin-resistant South African isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 1997;3:385-9.
- Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: Update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998;36:3447-54.
- Marton A, Gulyas M, Muñoz R, Tomasz A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Infect Dis* 1991;163:542-8.

7. Urbaskova P, Trupl J, Hupkova H, Appelbaum PC, Jacobs MR. *In vitro* susceptibility of pneumococci to trovafloxacin, penicillin G, and other antimicrobial agents in the Czech Republic and Slovakia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:686-8.
8. Trupl J, Hupkova H, Appelbaum PC, Jacobs MR. The incidence of penicillin resistant pneumococci in the Slovak Republic. *Pneumococcus Study Group. Chemotherapy* 1997;43:316-22.
9. Song JH, Lee NY, Ichiyama S, Yoshida R, Hirakata Y, Fu W, et al. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin Infect Dis* 1999;28:1206-11.
10. Doern GV, Pfaller MA, Kugler K, Freeman J, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 1998;27:764-70.
11. Doern GV, Brueggemann AB, Blocker M, Dunne M, Holley HP Jr, Kehl KS, et al. Clonal relationships among high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Clin Infect Dis* 1998;27:757-61.
12. McLaughlin VA, Riley TV, Roberts CL. Penicillin resistance in laboratory isolates of *Streptococcus pneumoniae*, in Western Australia, 1990-1994. *Eur J Epidemiol* 1998;14:611-5.
13. Hoefnagels-Schuermans A, Van Eldere J, Van Lierde S, Verbist L, Verhaegen J, Peetermans WE. Increase in penicillin resistance rates in Belgium due to clonal spread of a penicillin-resistant 23F *Streptococcus pneumoniae* strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:120-5.
14. Overweg K, Hermans PW, Trzcinski K, Sluijter M, De Groot R, Hryniewicz W. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: Identification of emerging clones. *J Clin Microbiol* 1999;37:1739-45.
15. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* 2000;30:454-60.
16. Ruvinski R. *Streptococcus pneumoniae*: un antiguo patógeno generando la emergencia de nuevos problemas epidemiológicos en el campo pediátrico *Arch Argent Pediatr* 2001;99:101-4.
17. Deeks SL, Palacios R, Ruvinski R, Kertesz DA, Hortal M, Rossi A, et al. Risk Factors and Course of Illness among children with invasive penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 1999;103:409-13.
18. Nagel A, Ahumada CA, Mollerach A, Méndez E. *Streptococcus pneumoniae*: detección de cepas resistentes a penicilina y comparación con otros antimicrobianos. *Infect Microbiol Clin* 1996;8:95-7.
19. Casellas JM. Neumococo penicilino resistente. Microbiología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento. En: Stamboulian D, editor. *Infectología para la práctica diaria*. Buenos Aires: FUNCEI, 1996.
20. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement 2003. Vol. 23 n° 1 y 2 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
21. Galas M, Corso A, Tokumoto M, Guelfand L, Rossi A. Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. *Red WHONET Argentina: Período 1994-1998 Rev. del Instituto de Higiene y Medicina Social*, 2000;4:16-26.
22. Sniadack DH, Schuartz B, Lipman H, Bogaerts J, Butler JC, Dagan R, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: Geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: Implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:503-10.
23. Hortal M, Lovgren M, De la Hoz F, Agudelo CI, Brandileone MC, Camou T, et al. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. *Microb Drug Resist* 2001;7:391-401.
24. Berezin EN, Carvalho ES, Casagrande S, Brandileone MC, Mimica IM, Farhat CK. *Streptococcus pneumoniae* penicillin non-susceptible (PNS-P) strains, in invasive infections in S.Paulo (Brasil). *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:1051-3.
25. Ruvinsky R, Regueira M, Gentile A, Corso A, Pace J, Bakir J, et al. Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 5 años en Argentina: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia. *Arch Argent Pediatr* 2002;100:31-43.
26. Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CI, Hoz FDL, Hortal M, Camou T, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. *Pan American Health Organization. Pediatr Infect Dis J* 2001; 10:959-67.
27. Culasco C, Carvajal L, Paolucci R, Ceballos A, Paredes M. *Streptococcus pneumoniae*: evolución de la resistencia a los antimicrobianos en un hospital de niños de Córdoba, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2001; 33:149-54.
28. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:171-96.
29. John CC. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994;18:188-93.
30. Chen DK, McGreer A, De Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluorquinolones in Canada. *N Engl J Med* 1999;341:233-9.