

# Meningitis experimental producida por una cepa de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F con elevada resistencia a cefalosporinas

Sandra Ribes<sup>a</sup>, Alejandro Doménech<sup>a</sup>, Carmen Cabellos<sup>b</sup>, Fe Tubau<sup>c</sup>, Josefina Liñares<sup>c</sup>, Pedro F. Viladrich<sup>b</sup> y Francesc Gudiol<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Infección Experimental. Servicios de <sup>b</sup>Enfermedades Infecciosas y <sup>c</sup>Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge. Hospital de Llobregat. Barcelona. España.

**INTRODUCCIÓN.** El aumento de cepas de *Streptococcus pneumoniae* con elevada resistencia a cefalosporinas supondría un problema en el tratamiento de las infecciones graves como la meningitis. Existen interrogantes sobre las características de estas cepas, como su capacidad para producir infecciones o la respuesta inflamatoria que generan en el líquido cefalorraquídeo.

**MÉTODOS.** Utilizando el modelo de meningitis neumocócica en conejo, se estudió la patogenicidad y las posibles diferencias en determinados parámetros inflamatorios de dos cepas de *S. pneumoniae* del serotipo 23F con distinta sensibilidad a betalactámicos. Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron: cepa A (penicilina, 4 µg/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 2 µg/ml); y cepa B (penicilina, 0,12 µg/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 32 µg/ml).

**RESULTADOS.** La cepa A mostró una mayor presencia de bacteriemia secundaria y parámetros inflamatorios superiores en las primeras etapas de la infección. La cepa B produjo edema cerebral, y mayor mortalidad y actividad inflamatoria a la hora 24.

**CONCLUSIONES.** Ambas cepas generaron meningitis en el modelo animal. Las diferencias en la respuesta inflamatoria producida por las dos cepas podrían estar relacionadas con las variaciones que determinan el grado de resistencia a betalactámicos.

**Palabras clave:** *Streptococcus pneumoniae*. Resistencia antibiótica. Meningitis neumocócica experimental.

Experimental meningitis due to a high-level cephalosporin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F

**INTRODUCTION.** The increasing prevalence of high-level cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus*

*pneumoniae* could complicate the treatment of severe infections such as meningitis. There are still questions as to the characteristics of these strains, their ability to produce severe infection, and the inflammatory response they induce in CSF.

**METHODS.** Using a rabbit model of meningitis, we sought to determine the pathogenicity and differences in inflammatory parameters in two serotype 23F *S. pneumoniae* strains with different susceptibility to betalactams. Minimal inhibitory concentrations of the two strains were as follows: strain A—PEN 4 µg/ml, CRO/CTX 2 µg/ml—and strain B—PEN 0.12 µg/ml, CRO/CTX 32 µg/ml.

**RESULTS.** Strain A resulted in a greater incidence of secondary bacteremia and higher inflammatory parameters during the early phases of infection. Strain B caused brain edema, a more severe inflammatory response and significantly higher mortality at the end of the experiment.

**CONCLUSIONS.** Both strains induced meningitis in the animal model. The differences in inflammatory response produced by the two strains could be related to the variations that determine the betalactam resistance level.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*. Drug resistance. Experimental pneumococcal meningitis.

## Introducción

España fue uno de los primeros países que presentó una alta prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina y otros antibióticos<sup>1</sup>. En la década de 1990, alrededor del 40% de los aislamientos de neumococo en líquido cefalorraquídeo (LCR) eran resistentes a penicilina, mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se situaba entre el 3 y el 20%<sup>2</sup>.

El aumento de la resistencia de *S. pneumoniae* a los betalactámicos constituye un problema terapéutico, especialmente en las enfermedades graves como la meningitis<sup>3-5</sup>. Se han documentado fracasos terapéuticos en meningitis producidas por cepas resistentes a cefalosporinas, sobre todo en aislamientos con una concentración inhibitoria mínima (CIM) mayor o igual a 2 µg/ml. Hasta el momento la práctica totalidad de casos resistentes han sido producidos por cepas con CIM igual a

Correspondencia: Dra. S. Ribes.  
Laboratorio de Infección Experimental (Lab. 4131).  
Hospital Universitario de Bellvitge.  
Feixa Llarga, s/n. Pabellón de Gobierno (4<sup>a</sup> planta).  
08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.  
Correo electrónico: sribes@bell.ub.es

Manuscrito recibido el 8-10-2002; aceptado el 31-12-2002.

1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Prácticamente no existe experiencia clínica ni estudios experimentales con cepas de mayor resistencia debido a su baja prevalencia, pero podrían convertirse en un problema clínico en el futuro.

Por otra parte, han surgido interrogantes sobre las características de estas cepas, como su capacidad para producir infecciones graves o la actividad inflamatoria que presentan<sup>6</sup>. Se ha sugerido que el serotipo influye en la gravedad de la meningitis neumocócica. La capacidad de generar una respuesta inflamatoria leve, moderada o grave, estaría relacionada con las características propias de cada serotipo para colonizar e invadir al organismo huésped<sup>7,8</sup>.

El serotipo 23F presenta resistencia a penicilina y cefalosporinas con elevada frecuencia, e induce una gran respuesta inflamatoria en el LCR en el modelo animal en conejo<sup>6,8</sup>.

Utilizando el modelo de meningitis experimental en conejo, se ha intentado examinar la capacidad de inducir meningitis y las posibles diferencias en la respuesta inflamatoria en el LCR producidas por dos cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes al serotipo 23F con distinta sensibilidad a betalactámicos. Se han estudiado los recuentos bacterianos y de leucocitos, la concentración de ácido láctico y proteínas en LCR, la bacteriemia secundaria a la hora 0, y la mortalidad y el edema cerebral al final del experimento.

## Métodos

### Cepas de estudio

Se utilizaron dos cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes al serotipo 23F, con distinta sensibilidad a betalactámicos. Tanto la cepa A (SUB 2349) como la cepa B (ATCC 51916)<sup>4,9</sup> fueron aisladas del LCR de pacientes con meningitis. Las CIM de la cepa A fueron: penicilina, 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ceftriaxona/cefotaxima, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; y de la cepa B: penicilina, 0,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ceftriaxona/cefotaxima, 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Las suspensiones bacterianas se prepararon resuspendiendo en caldo de soja-triptona (TSB) algunas colonias de cultivos frescos de placas de agar soja-triptona (TSA) con 5% de sangre de cordero. Al cabo de 3 h de incubación, el inóculo se lavó por centrifugación, se resuspendió en suero fisiológico y se ajustó al estándar 0,5 McFarland ( $10^8$  unidades formadoras de colonias [UFC]/ml). Se realizaron diluciones seriadas (1:10) en suero fisiológico y se subcultivaron 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en placas de TSA para conocer el inóculo exacto.

### Pruebas de sensibilidad

La CIM se determinó mediante el método de microdilución en caldo utilizando un volumen de 100  $\mu\text{l}$ , tal y como recomienda el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)<sup>10</sup>. Las CIM se comprobaron mediante E-test (E-test; AB Biodisks). En el método de dilución se utilizó caldo de Mueller-Hinton enriquecido con un 3-5% de sangre lisada de caballo y suplementada con cationes  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (MH SLC CaMg) y se realizaron diluciones seriadas de antibiótico desde una concentración de 128 a 0,008  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El inóculo final en ambos métodos fue de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Las concentraciones de antibiótico se comprobaron de forma paralela con las cepas control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *S. pneumoniae* ATCC 49619. El E-test se realizó como un método de difusión en agar, utilizando placas de agar base de Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero, sembrando una suspensión de microorganismos de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml (0,5 McFarland). En los dos métodos, las CIM se determinaron tras 18-20 h de incubación en atmósfera con 5% de dióxido de carbono y a 35 °C. La CIM en el método de dilución en caldo se definió como la concentración

más baja de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible. La lectura de la CIM en el método de E-test se realizó en el punto de intersección de inhibición de crecimiento y la tira de E-test, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### Modelo experimental de meningitis

Se desarrolló una modificación del protocolo descrito por Dacey y Sande<sup>11</sup>, con conejos blancos de Nueva Zelanda, hembras de 2 kg de peso. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona (Campus de Bellvitge).

El tamaño de la muestra (*n*) al inicio del estudio fue de 10 conejos para cada cepa. Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con 3,5 mg de ketamina (Ketolar®, Parke-Davis, El Prat de Llobregat, España) y 5 mg de xilacina (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) por kilogramo de peso corporal. Se les fijó un casco de cemento acrílico en la calota craneal para sujetarlos en un aparato de estereotaxia. La fijación del casco a este soporte metálico estereotáxico permite la extracción de LCR a lo largo del experimento.

A las 24 h, los conejos fueron anestesiados con idéntica pauta y, mediante una aguja de punción lumbar, se extrajo por vía intracisternal una muestra de 0,2 ml de LCR (muestra pre) y se les inocularon 0,2 ml de una suspensión de  $10^6$  UFC/ml de la cepa de *S. pneumoniae* correspondiente. Los animales fueron anestesiados por vía subcutánea 18 h después (SC) con 1,75 mg/kg de uretano al 20% (Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.). Se extrajo una muestra de 0,1 ml de sangre de la vena marginal de la oreja del animal para hemocultivo, y una muestra de 0,2 ml de LCR (hora 0), representativa de la meningitis basal. Se obtuvieron muestras seriadas de 0,2 ml de LCR a las horas: 2, 6 y 24. Se aseguró la correcta hidratación de los animales administrando suero fisiológico por vía subcutánea a lo largo del experimento.

A la hora 24 se estudió la mortalidad. Los animales que sobrevivieron fueron sacrificados mediante una sobredosis letal de tiopental sódico (Penthalal® sódico, Abbott Laboratories, Madrid). A continuación se extrajeron los cerebros para la cuantificación del edema cerebral, por comparación entre el peso húmedo (inmediatamente después de la extracción) y el peso seco (tras 7 días en estufa a 100 °C). Se consideró edema cerebral a los valores superiores a 400 g de agua/100 g de peso seco<sup>12</sup>.

### Procesamiento de las muestras

A partir de la muestra pre se cultivaron 10  $\mu\text{l}$  para comprobar la esterilidad del LCR al inicio del experimento.

El hemocultivo se realizó en un tubo de 5 ml de TSB y se incubó a 37 °C. A las 24 h, se cultivaron 0,1 ml en una placa de TSA para determinar la posible presencia de bacteriemia secundaria.

Con las muestras de LCR de las horas 0, 2, 6 y 24 se realizaron recuentos bacterianos por diluciones seriadas (1:10) y siembra en placas de TSA. También se realizó un recuento de leucocitos/ $\mu\text{l}$  mediante una cámara de Neubauer, una vez lisados los hematies con solución Türk. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min y el sobrenadante se distribuyó en alícuotas que se congelaron a -80 °C. Posteriormente, se determinó la concentración de ácido láctico por el método enzimático Lactate PAP (bioMérieux SA, 69280 Marcy l'Etoile, Francia) y lectura en espectrofotómetro (505 nm)<sup>13</sup>. La concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, BioRad Laboratories, München, Alemania) y lectura en espectrofotómetro (595 nm)<sup>14</sup>.

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron en forma de media  $\pm$  desviación estándar (DE).

Para comprobar que cada variable seguía una distribución normal, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar si existían diferencias en los parámetros inflamatorios entre las dos cepas, se compararon las medias utilizando la prueba de la t de Student. La mortalidad, la bacteriemia secundaria y la presencia de edema cerebral se estudiaron mediante el test de Fisher. Se consideró significación estadística un valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

A las 18 h postinoculación, todos los conejos del grupo de la cepa A ( $n = 10$ ) y los del grupo de la cepa B ( $n = 9$ ) presentaron cultivos positivos en LCR. Las curvas de crecimiento bacteriano en el tiempo para las dos cepas se representan en la figura 1. No se encontraron diferencias significativas excepto en los recuentos bacterianos ( $\log_{10}$  UFC/ml) de la hora 0 ( $p = 0,018$ ).

Los valores de los parámetros inflamatorios en cada muestra horaria para las dos cepas se resumen en la tabla 1. En los conejos inoculados con la cepa A, la media de leucocitos/ $\mu$ l de LCR a la hora 0 fue ligeramente inferior a la que presentaron los animales infectados con la cepa B. Los recuentos leucocitarios de las horas 2 y 6 fueron equivalentes para los dos grupos. La pleocitosis disminuyó a la hora 2 y se mantuvo estable a la hora 6. A la hora 24, el número de leucocitos en los conejos inoculados con la cepa B fue significativamente mayor ( $p = 0,006$ ) al del grupo de la cepa A.

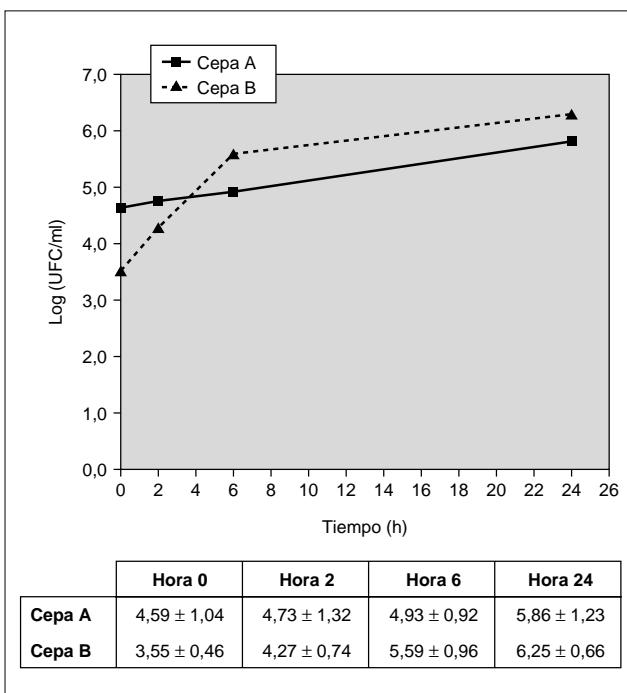
La concentración de lactato fue superior en la cepa A en las primeras horas de la infección, con diferencias significativas a la hora 6 ( $p = 0,002$ ). A la hora 24, el nivel de lactato fue mayor en la cepa B.

Los niveles de proteína fueron mayores en la cepa A al inicio de la infección, estadísticamente superiores a la hora 0 ( $p = 0,038$ ). A la hora 24, la concentración de proteínas fue mayor en los animales infectados con la cepa B.

La bacteriemia secundaria a la hora 0 fue mayor en la cepa A: un 80% (8/10) de los animales presentaron hemocultivo positivo frente a un 44,44% (4/9) del grupo inoculado con la cepa B. No se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,13$ ).

La mortalidad a la hora 24 fue mayor en la cepa B. Con una clara tendencia a la significación estadística ( $p = 0,05$ ), el 77,8% de los conejos infectados con la cepa B murió frente a un 30% del grupo inoculado con la cepa A.

En la figura 2 se representa la dispersión de los datos de edema cerebral de cada conejo. Todos los conejos inoculados con la cepa B presentaron edema cerebral, mientras que en el grupo infectado con la cepa A sólo el 50% superó el punto de corte de 400 g de agua/100 g de peso seco que define el edema cerebral. Existe una tendencia a la significación estadística en la presencia de edema cerebral producida por las dos cepas ( $p = 0,05$ ).



**Figura 1.** Recuentos bacterianos ( $\log_{10}$  UFC/ml) en el LCR de conejos en los diferentes puntos horarios, tras la inoculación de  $10^6$  UFC/ml de la cepa de *Streptococcus pneumoniae* 23F correspondiente. Datos en  $\bar{X} \pm DE$ . CÍM de la cepa A: penicilina, 4  $\mu$ g/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 2  $\mu$ g/ml; y de la cepa B: penicilina, 0,12  $\mu$ g/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 32  $\mu$ g/ml.

## Discusión

Este trabajo demuestra la patogenicidad de una cepa de *S. pneumoniae* 23F con elevada resistencia a cefalosporinas de 3G en el modelo de meningitis experimental. Además se ha comparado con la capacidad de inducir meningitis de una cepa de *S. pneumoniae* 23F con el patrón de resistencia que se encuentra habitualmente. En ambas cepas se ha observado la capacidad de generar una respuesta inflamatoria que se caracteriza por un aumento del número de leucocitos, de las concentraciones de lactato y proteínas, y la posible aparición de edema cerebral.

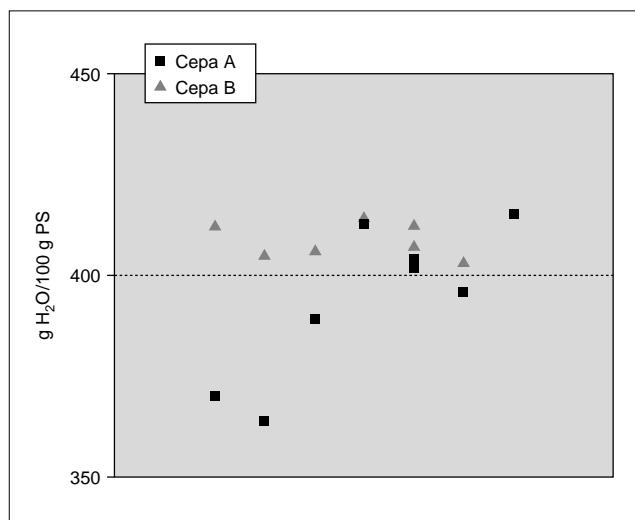
*S. pneumoniae* 23F es uno de los serotipos neumocócicos que presenta bacteriemia secundaria con mayor

**TABLA 1. Recuento de leucocitos, concentración de ácido láctico y concentración de proteínas en el líquido cefalorraquídeo de conejos infectados con dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* 23F**

Parámetro inflamatorio	Hora 0	Hora 2	Hora 6	Hora 24
<b>Cepa A</b>				
Leucocitos (cél./ $\mu$ l)	5.133 ± 3.564 (9)	3.680 ± 2.393 (9)	3.391 ± 1.522 (7)	2.908 ± 1.321 (6)*
Ácido láctico (mmol/l)	5.056 ± 1.213 (10)	4.587 ± 1.115 (10)	4.519 ± 0.840 (10)*	7.809 ± 5.212 (7)
Proteínas (g/l)	2.077 ± 1.103 (10)*	2.229 ± 1.122 (10)	1.981 ± 0.810 (10)	3.384 ± 1.910 (7)
<b>Cepa B</b>				
Leucocitos (cél./ $\mu$ l)	6.760 ± 4.197 (8)	3.677 ± 1.337 (7)	3.893 ± 2.023 (7)	6.710 ± 1.949 (4)
Ácido láctico (mmol/l)	4.202 ± 1.602 (9)	3.737 ± 1.264 (7)	3.142 ± 0.696 (8)	11.071 ± 4.069 (4)
Proteínas (g/l)	1.123 ± 0.494 (8)	1.421 ± 0.685 (7)	1.470 ± 0.755 (8)	4.420 ± 2.866 (4)

Datos en media ± desviación estándar y número de animales (n).

\*  $p < 0,05$  entre cepas A y B.



**Figura 2.** Dispersión de los valores de edema cerebral (g de agua/100 g de peso seco) en el cerebro de los conejos inoculados por las cepas A y B. El punto de corte que define la presencia de edema cerebral es 400 g H<sub>2</sub>O/100 g de PS.

frecuencia<sup>15</sup>. En nuestro estudio, la aparición de bacteriemia secundaria fue mayor en la cepa A, pero no existieron diferencias significativas respecto a la cepa B.

A partir de los parámetros experimentales estudiados se observaron diferencias en la respuesta inflamatoria producida por las dos cepas de *S. pneumoniae* 23F con distinta sensibilidad a betalactámicos. En las primeras horas de la infección, el recuento de leucocitos siguió un patrón similar para las dos cepas, mientras que los niveles de lactato y proteína fueron superiores en los animales infectados con la cepa A. No obstante, a la hora 24 el número de leucocitos en los conejos inoculados con la cepa B aumentó y fue significativamente superior al de la cepa A. También la concentración de lactato y proteínas fue mayor en el grupo de la cepa B al final del experimento.

De acuerdo con la literatura médica<sup>8</sup>, se observó que la cepa B generó una respuesta inflamatoria grave a la hora 24: recuento de leucocitos > 5.000/ $\mu$ l; niveles de lactato > 10 mmol/l y concentración de proteínas > 2 g/l. A la hora 24, la cepa A mostró una respuesta inflamatoria moderada respecto a la pleocitosis y la concentración de lactato, pero grave si se tiene en cuenta la concentración de proteínas.

Para la cepa B, la mortalidad a la hora 24 y el edema cerebral mostraron una clara tendencia a la significación estadística, siendo ambos parámetros superiores respecto a la cepa A. De acuerdo con estos resultados, una respuesta inflamatoria grave provocaría una mayor mortalidad y la aparición de edema cerebral.

La virulencia de una cepa depende de sus características intrínsecas y de la condición del huésped al ser colonizado. En esta dura batalla se liberan una serie de productos de la pared celular que generarán una respuesta inflamatoria específica. Algunos estudios con modelos animales de infección neumocócica muestran que la sensibilidad a penicilina se asocia a una mayor virulencia<sup>16,17</sup>, aunque la relación entre la adquisición de resistencia a los betalactámicos en general y la pérdida de virulencia sigue siendo un problema muy complejo.

La resistencia a betalactámicos en *S. pneumoniae* se debe a alteraciones de las proteínas fijadoras de penicilina (en inglés *penicillin-binding proteins*, PBP) que provocan una disminución de la afinidad de las PBP por estos antibióticos<sup>18,19</sup>. Estudios de análisis genético de las cepas A y B permitieron hallar las PBP involucradas en la resistencia a penicilina y cefalosporinas de 3G. En la cepa A se encontraron mutaciones en la *PBP1a* y en la *PBP2x* (datos no publicados); también en la cepa B se encontraron alteraciones en *PBP1a* y *PBP2x*<sup>20</sup>. Coffey et al<sup>20</sup> sugieren que una simple sustitución de Thr-550 → Ala en la *PBP2x* sería la responsable de la resistencia de alto nivel a cefotaxima, presente en la cepa B.

Las diferencias encontradas en la actividad inflamatoria y en la virulencia de estas cepas podrían ser independientes de los epitopos determinantes de serotipo y estar relacionadas con las variaciones en la pared celular que dan los distintos grados de resistencia a betalactámicos. Cada cepa tiene unas características intrínsecas que sumadas a los factores externos procedentes del huésped, producen un comportamiento totalmente específico.

En conclusión, este trabajo muestra la capacidad de inducir meningitis de una cepa con una CIM = 32  $\mu$ g/ml para ceftriaxona/cefotaxima, y la posible existencia de diferencias en la respuesta inflamatoria inicial y en la mortalidad a la hora 24 de la meningitis producida por dos cepas de *S. pneumoniae* del mismo serotipo.

Estos hallazgos justifican la realización de estudios de eficacia antibiótica en el modelo animal para encontrar alternativas en el tratamiento de la meningitis neumocócica producida por cepas con elevada resistencia a ceftriaxona/cefotaxima.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por la beca 01/1235 procedente del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISs).

Sandra Ribes disfrutó de una beca procedente de la Fundació August Pi i Sunyer.

Alejandro Doménech disfrutó de una beca procedente de la Universidad de Barcelona.

#### Bibliografía

1. Casal J. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:222-5.
2. 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.
3. Viladrich PF, Gudiol F, Liñares J, Rufi G, Ariza J, Pallarés R. Characteristics and antibiotic therapy of adult meningitis due to penicillin-resistant pneumococci. *Am J Med* 1988;84:839-46.
4. Sloas MM, Barreto FF, Chesney PJ, English BK, Hill BC, Tenover FC, et al. Cephalosporin treatment failure in penicillin- and cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1991;11: 662-6.
5. Catalán MI, Fernández JM, Vázquez A, Varela de Seijas E, Suárez A, Bernardo de Quirós JCL. Failure of cefotaxime in the treatment of meningitis due to relatively resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1994; 18:766-9.
6. Fernández A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. Relationship between penicillin and cephalosporin resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains and its inflammatory activity in the experimental model of meningitis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001;190:135-8.

7. Tauber MG, Burroughs M, Niemoller UM, Kuster H, Borschberg U, Tuomanen E. Differences of pathophysiology in experimental meningitis caused by three strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991;163:806-11.
8. Engelhard D, Pomeranz S, Gallily R, Strauss N, Tuomanen E. Serotype-related differences in inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in experimental meningitis. *J Infect Dis* 1997;175:979-82.
9. McDougal LK, Rasheed JK, Huidle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2282-8.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard – Fifth Edition. NCCLS document M7-A5 (ISBN 1-56238-394-9). NCCLS, 2000.
11. Dacey RG, Sande MA. Effects of probenecid in cerebrospinal fluid concentration of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1974;6:437-41.
12. Tauber MG, Khayam-Bashi H, Sande MA. Effects of ampicillin and corticosteroids on brain water content, cerebrospinal fluid pressure, and cerebrospinal fluid lactate levels in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1985;151:528-34.
13. Shimjo N, Naka K, Nakajima C, Yoshikawa C, Okuda K, Okada K. Test-strip method for measuring lactate in whole blood. *Clin Chem* 1989;35:1992-4.
14. Duhamel RC, Meezan E, Brendel J. Determination of protein in cerebrospinal fluid, a new method. *J Biochem Biophys Methods* 1981;5:67-74.
15. Alpern ER, Alessandrini EA, McGowan KL, Bell LM, Shaw KN. Serotype prevalence of occult pneumococcal bacteraemia. *Pediatrics* 2001;108:E23.
16. Azoulay-Dupuis E, Vallée B, Bédos JP, Bauchet J, Pocidalo JJ. *In vivo* efficacy of a new fluoroquinolone, sparfloxacin, against penicillin-susceptible and -resistant and multiresistant *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2698-703.
17. Rieux V, Carbon C, Azoulay-Dupuis E. Complex relationship between adquisition of  $\beta$ -lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2001;184:66-72.
18. Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A. Multiple change of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:364-71.
19. Muñoz R, Dowson DG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, Hakenbeck R, et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1992;17:2461-5.
20. Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1306-13.