

870127

22  
201

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



## SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 30 CEPAS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE A LA PENICILINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

NORMA GUADALUPE ROSALES CORTES

ASESOR: O. F. B. MA. DEL SOCORRO PULIDO GARCIA

GUADALAJARA, JAL.

1990

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

1.- INTRODUCCION.	
1.1. Objetivos del estudio.....	8
2.- GENERALIDADES.	
2.1. Datos históricos.....	9
2.2. Taxonomía y nomenclatura.....	11
2.3. Constitución morfológica, fisiológica y bioquímica del <u>Streptococcus pneumoniae</u> .....	12
2.4. Estructura antigénica.....	16
2.5. Variaciones genéticas.....	18
2.6. Frecuencia y significación de tipos serológicos..	19
2.7. Patogenicidad.....	21
2.8. Resistencia a los antibióticos.....	22
2.9. Susceptibilidad a la penicilina.....	24
3.- MATERIAL Y METODOS.	
3.1. Procedencia de las cepas.....	27
3.2. Metodología microbiológica.....	27
3.2.1. Reaislamiento.....	27
3.2.2. Identificación.....	27
3.2.3. Pruebas de susceptibilidad.....	28
4.- RESULTADOS.....	33
5.- DISCUSION.....	38
6.- CONCLUSIONES.....	40
7.- BIBLIOGRAFIA.....	41

GRACIAS SEÑOR:

Por los dones recibidos  
en el transcurso de mi vida,  
permitiendome ver alcanzada  
esta meta. Gracias Señor.

CON AMOR Y RESPETO A MIS PADRES:

Dr. Manuel Rosales Abreú,  
Q.F.B. Cleotilde Celia Cortés Díaz de R.,  
IN MEMORIAM, 1988.

PAPA: Gracias por tu amor, ayuda, en momentos tan dolorosos que hemos pasado a falta de mi mamá, gracias te doy por tus sacrificios y todo lo bueno que he recibido durante mi vida.

MAMA: A falta de ti mamá, que siempre me ayudaste con la orientación, dedicación y -- amor; quisiera que aunque no estés conmigo físicamente, te sientas contenta de -- que haya llegado a esta meta.

A MIS HERMANOS:

Francia,  
Coty,  
Gaby,  
Manuel.

A MIS SOBRINAS:

Francita,  
Claudia,  
Christian.

CON AFECTO A MIS TIOS:

Lic. y C.P. Aurelio Cortés Díaz y Fam.,  
Sr. Héctor Cortés Díaz y Fam.,  
Sra. Graciela Gma. Cortés Vda. de Rosales  
y Familia,  
Srita. Profra. Rosario Rosales.

**CON RESPETO Y AGRADECIMIENTO:**

Por su grandiosa ayuda para realización de esta  
Tesis:

Dr. Alejandro Cruz Luna,  
Q.F.B. Ma. Socorro Pulido,  
Dr. Jaime Mendiola Gómez.

**A MIS COMPAÑEROS Y MAESTROS:**

Con los que compartí momentos tan bonitos y -  
aprendí de ellos grandes cosas.

**A MIS COMPAÑERAS:**

Que desde la prepa hemos estado siempre tan -  
unidas:

Martha Rodríguez,  
Lily Valencia,  
Cristina Sánchez,  
Lola González,  
Bonnie Altamirano.

## 1.- INTRODUCCION.

El Streptococcus pneumoniae es un habitante de las vías respiratorias superiores; se le aísla en un 30 a 70% de la faringe normal, por lo que es el causante de muchas infecciones severas, siendo la principal, la neumonía neumocócica, que ataca los pulmones y es caracterizada por un ataque repentino de escalofrío, fiebre, dolor en el tórax y tos; aunque en la actualidad la terapia antimicrobiana ha sido de gran ayuda. (21)

Sir. Williams Osler escribió su famoso libro "Muerte en el hombre", antes de la venida de las sulfonamidas y la introducción de la penicilina. Esto quiere decir que las enfermedades causadas por el Streptococcus pneumoniae fueron consideradas realmente mortales. La neumonía neumocócica está entre las enfermedades más comunes, ocupando el número 10; además hay un caso de neumonía neumocócica por cada 500 personas en los Estados Unidos.

Las infecciones causadas por el Streptococcus pneumoniae frecuentemente son más numerosas durante el invierno, cuando hay predisposición a infecciones virales, como la gripe, siendo ésta una de las causas para adquirir una infección por Streptococcus pneumoniae. Puesto que raramente es una infección primaria y resulta cuando las defensas se encuentran bajas, por enfriamientos, anestésicos, intoxicación alcohólica y drogas, etc.

Un 75% de las infecciones causadas por Streptococcus pneumoniae en los adultos es causada por 9 tipos antigénicos: Los tipos 1, 2, 4, 5, 12, 14 y 19. Durante los últimos años la predominancia del tipo capsular ha cambiado; una transfe-



rencia ha sido observada en el tipo 1, 2 y 3. En infantes es más frecuentemente el tipo 14; por lo que la tipificación serológica fue importante con antisueros tipo específicos antes de la venida de la moderna quimioterapia. (20)

Hasta nuestros días, siempre se había tenido el concepto de que la mayor parte de las cepas de Streptococcus pneumoniae aislado de especímenes clínicos, eran susceptibles a la penicilina. Pero desde 1967 en Nueva Guinea y sur de Australia, donde Hansman y Bullen reportaron la primera cepa de Streptococcus pneumoniae que eran relativamente resistentes a la penicilina. Esta relativa resistencia correspondía a una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,1 a 2 microgramos por mililitro. (12)

Cepas relativamente resistentes a la penicilina, donde la Concentración Inhibitoria Mínima fue igual o menor de un microgramo por mililitro, ha sido reportada en Australia, Nueva Guinea, Canadá, Inglaterra y Estados Unidos.

Durante 1877 en Durban, Sudáfrica, las cepas aisladas de Streptococcus pneumoniae del tipo A, fueron solamente resistentes al cloranfenicol, donde su Concentración Inhibitoria Mínima era de 4 microgramos por mililitro, mientras que en Londres Inglaterra fue de 2.5 microgramos por mililitro; Concentración Inhibitoria Mínima. (19)

En 1981 los Estados Unidos reportaron la primera cepa de Streptococcus pneumoniae con resistencia a múltiples antibióticos. En estos estudios, aislaron una cepa de serotipo 6 B que presentaba una extraña resistencia a múltiples drogas, como penicilina G, tetraciclina y cloranfenicol. (24)

Estos organismos son aislados de pacientes, casi siempre

pediátricos, con infecciones neumocóccicas, como: neumonía, -  
meningitis, otitis media, bacteremias y fiebre de origen obs  
curo etc...., por lo que su resistencia a los antibióticos -  
puede causar la muerte por un tratamiento no adecuado.

### 1.1.- Objetivo del estudio.

Se pretendió en este estudio la susceptibilidad de el -- Streptococcus pneumoniae a la penicilina, por el método de dilución en tubo para obtener la Concentración Inhibitoria Mínima, para de esta manera poder tener una muestra confiable y poder asegurar si existen cepas resistentes o no, y si en un momento dado se requeriría practicar antibiograma rutinariamente a todos ellos.

La Concentración Inhibitoria Mínima: Es La Concentración menor del antibiótico que inhibe o evita el desarrollo macroscópico del cultivo bacteriano después de la incubación durante 24 horas.

La Concentración Bactericida Mínima: Es La Concentración menor del antibiótico que inhibe el desarrollo macroscópico del cultivo bacteriano después de incubar durante 48 horas.

## 2. GENERALIDADES.

### 2.1. DATOS HISTORICOS.

El conocimiento sistemático de las propiedades del Strep tococcus pneumoniae (neumococo) como agente patógeno, ha dado lugar a algunos descubrimientos importantes de las ciencias - biomédicas. Aislado por primera vez a partir de la saliva humana por Pasteur en 1881 en Francia y por Stenberg en los Estados Unidos; su relación con la neumonía lobular fue establecida pocos años después. El reconocimiento de los distintos tipos serológicos del neumococo en 1910 condujo a la obtención de específicos, y con ello, al tratamiento eficaz de la neumonía neumocócica. Siguió luego las observaciones fundamentales de Avery, Heidelberger y Goebel sobre la estructura química de los antígenos capsulares y su papel en la virulencia bacteriana. El descubrimiento de los antígenos capsulares tuvo importancia sobre la inmunología como ciencia. - - Griffith en 1928 observó que las células de neumococos de un tipo serológico podría transformarse en células neumocócicas de otro tipo en vivo, así descubrieron Avery, MacLeod y McCarty que el constituyente químico de las células neumocócicas es el responsable de la reacción de transformación en su DNA. Este hallazgo abrió la puerta a la genética molecular y marcó el principio de la actual revolución de los conceptos - biológicos.

La neumonía neumocócica antiguamente, era causa frecuente de muerte. En la actualidad puede ser tratada eficazmente con penicilina y otros medicamentos antimicrobianos. Aunque constituye todavía una enfermedad grave, es frecuente la recu

peración, excepto si el inicio de la terapéutica se retrasa o si el paciente se halla debilitado por otras enfermedades.

## 2.2. TAXONOMIA Y NOMENCLATURA.

Streptococcus pneumoniae se clasifica dentro de la familia Streptococcaceae, y recibe el nombre genérico de Streptococcus (del griego streptos sinuoso) por su tendencia a agruparse en pares, cadenas y tetradas.

### COCOS GRAM-POSITIVOS.

1.- Aeróbicos, anaeróbicos facultativos o microaerófilos.

#### FAMILIA I. MICROCOCCUS.

Género I. MICROCOCCUS.  
Género II. STHAPHYLOCOCCUS.  
Género III. PLANOCOCCUS.

#### FAMILIA II. STREPTOCOCCACEAE.

Género I. STREPTOCOCCUS.  
Género II. LEUCONOSTOC.  
Género III. PEDIOCOCCUS.  
Género IV. AEROCOCCUS.  
Género V. GEMELLA.

2.- Anaeróbicos.

#### FAMILIA III. PEPTOCOCCACEAE.

Género I. PEPTOCOCCUS.  
Género II. PEPTOSTREPTOCOCCUS.  
Género III. RUMINOCOCCUS.  
Género IV. SARCINA.

### 2.3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.

En la actualidad Streptococcus pneumoniae se considera perteneciente al género Streptococcus más que al Diplococcus. Este último todavía se utiliza debido a que resulta más familiar. (6)

Streptococcus pneumoniae es un habitante de las vías respiratorias del hombre y de seguro de animales, causando infecciones primariamente del tracto respiratorio y áreas contiguas. Es el agente etiológico de la neumonía neumocócica. (20)

Streptococcus pneumoniae es aislado de la faringe en un 30 a 70% aparentemente en individuos normales.

Streptococcus pneumoniae en su forma más característica, son diplococos lanceolados, capsulados gram positivos de 0,5 a 1,25 micras de diámetro. En los esputos, pus, líquidos serosos y tejidos del cuerpo pueden hallarse formando cadenas cortas y en ocasiones, como cocos individuales. Su tendencia a formar cadenas aumenta cuando crecen en medios desfavorables (particularmente concentraciones bajas de magnesio) o en presencia de anticuerpos tipo específicos. Aunque son gram positivas durante la fase exponencial de crecimiento en medios artificiales, se vuelven gram negativas de modo progresivo al envejecer los cultivos. Si la incubación continúa, disminuye el número de células viables. Este cambio se debe a la acción de las enzimas autolíticas que primero transforman las células gram negativas y posteriormente causan la lisis. (7, 20, 21)

El PH óptimo para el crecimiento de Streptococcus pneumoniae es de 7,4 a 7,8, requiriendo además un aumento en la con

centración de CO<sub>2</sub> para el crecimiento primario sobre medio sólido. (7, 20)

En la superficie de los medios sólidos, Streptococcus pneumoniae se ha caracterizado por su apariencia, incubado de 24 a 36 horas en agar sangre con atmósfera de CO<sub>2</sub>, los organismos encapsulados forman colonias redondas, brillantes no pigmentadas, con orillas completas, húmedas y llegando a medir de 0,5 a 1,5 milímetros de diámetro. (6, 7, 20, 21)

La diferenciación de Streptococcus pneumoniae de Streptococcus viridans es difícil, siendo su morfología colonial parecida como al observar al microscopio la tinción de Gram se encuentran en cadenas y pares, su hemólisis es alfa. La manera más sencilla para diferenciarlas es la utilización de discos de optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), inhibiéndose el crecimiento de Streptococcus pneumoniae. La solubilidad es bilis donde las colonias de Streptococcus pneumoniae son lisadas. (6, 7, 20)

Las colonias mayores y mucoides son las que corresponden a organismos con mayor cápsula; como los del tipo 3, que alcanzan un diámetro de 3 milímetros, que al envejecer, el centro de la colonia se deprime por autólisis. (7, 20)

Las colonias de Streptococcus pneumoniae alfa hemolíticas están rodeadas por una zona estrecha de hemólisis en la que microscópicamente se observan hematias no hemolizados, -- junto a las colonias. Esta zona interna de células rojas no hemolizadas está rodeada por otra zona de hemólisis completa. Apareciendo una coloración tono verdosa alrededor de las colonias (debido a la formación de un producto reducido de la hemoglobina, no identificado), según el tipo de sangre existente en el medio y la duración del período de incubación. (7)



Las cápsulas de Streptococcus pneumoniae se observan más fácilmente al suspender los organismos encapsulados en la tinta china. Siendo también visibles en las células tratadas -- con anticuerpos tipo específicos en las cuales, al combinarse con polisacárido capsular, lo vuelve refráctil (reacción del Quellung). (6, 7, 20)

Streptococcus pneumoniae es un organismo anaeróbico facultativo usando un rango amplio de carbohidratos fermentables. Sus requerimientos energéticos son aportados fundamentalmente por fermentaciones de tipo ácido láctico, clasificadas junto con los Streptococcus como, bacterias acidolácticas. (7, 20) No crece en medios deshidratados, ni los que contienen carne fresca. Cuando el caldo de cultivo se encuentra en presencia de oxígeno se oxida, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Pero al adicionar agentes reductores como la cisteína y tioglicolate crece el organismo en condiciones óptimas. (7) Streptococcus pneumoniae no produce catalasa, ni peroxidasa, siendo un anerobio facultativo, habiendo acumulación de peróxido de hidrógeno, que afecta su vida, por lo que se recomienda que los cultivos de neumococos tengan una fuente de catalasa en el medio para facilitar la descomposición del peróxido de hidrógeno. Los medios ricos en glucosa estimulan la producción capsular. (7, 20)

Los requerimientos nutricionales de Streptococcus pneumoniae para un óptimo crecimiento y la ausencia de esto provoca defectos fisiológicos, como incapacidad de la célula para dividirse, resistiendo la autólisis, perdiendo la capacidad para sufrir transformaciones genéticas y no habiendo lisis aunque crezcan en presencia de penicilina. Estos requerimientos son alcohol nitrogenado y la colina. Muchos de estos defectos son debidos a los cambios en el ácido teicóico en la capa superficial del organismo. El 85% de la colina celular forma

da en el ácido teicóico de la pared celular. Los residuos de colina del ácido teicóico son esenciales para la regulación de la actividad autolítica. (7, 20)

ETALONAMINA       $(\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2)$

COLINA             $(\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$

#### 2.4. ESTRUCTURA ANTIGENICA.

Se han diferenciado más de 82 tipos serológicos de Streptococcus pneumoniae por la existencia de polisacáridos inmuno lógicamente diferentes en sus cápsulas. (20)

Las cápsulas del neumococo están compuestas por grandes polímeros de polisacáridos de alto peso molecular que forman geles hidrófilos en la superficie bacteriana. Actualmente se conocen la mayoría de los hidratos de carbono capsulares, pero solo se han determinado las estructuras del tipo 3, 6 y 8. El polisacárido 3 está formado de unidades repetidas del ácido celobiurónico (D-ácido glucorónico beta 1-4 unido a D-glucosa) unida por puentes 1,3 glucósidos. (20,7)

Los antígenos capsulares de Streptococcus pneumoniae presentan reacciones cruzadas con otros tipos de Streptococcus - entre las que se encuentra S. Viridanss, Klebsiella conocido como bacilo de Friedlander, Salmonella y eritrocitos del grupo A humano. (7, 20)

El antígeno del tipo 8 contiene D-glucosa, D-galactosa y D-ácido celbiurónico, reaccionando de forma cruzada con el antígeno del tipo 3. El antígeno del tipo 12 interactúa con la conovalina y la unión ocurre a través de los residuos de Kojilbiosly (O-alfa\_D-glucopironesil-(1-2)-D-glucosa en el polisacárido de Streptococcus pneumoniae. Es por esto que el humano y animales tienen anticuerpos que les protegen contra el polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae, siendo esencial para su patogenicidad.

La virulencia de Streptococcus pneumoniae tiene relación con el tamaño capsular, por lo que las variantes intermedias con cápsula completa como el tipo 3. Pero la virulencia es -

distinta según el tipo de antigénico, aunque su cápsula sea del mismo tamaño, como en el caso de los tipos 3 y 37.

Las cepas rugosas carecen de cápsula siendo su virulencia menor, en cambio las cepas lisas capsuladas son patógenas para el humano, mientras que la inmunización activa o pasiva frente a los polisacáridos específicos dá una elevada resistencia frente a las infecciones por Streptococcus pneumoniae de tipo homólogo. La fagocitosis se desconoce, no se sabe si la presencia de cápsula interfiere. (7,20).

Los antígenos somáticos aislados en 1930 por Tillet y Avery de células de Streptococcus pneumoniae contenían fosfato, a diferencia de los polisacáridos capsulares, siendo específicos de especies. Este antígeno de la pared celular es el componente mayor de la estructura celular, nombrado sustancia C neumococcica, parece ser análogo al antígeno grupo específico C de los Streptococcus hemolíticos.

El antígeno C es un polímero del ácido teicoico que es rico en fosforil colina, galactosamina-6-fosfato, componentes mayoritarios de la pared celular. El antígeno C está localizado en el exterior de la superficie de la membrana celular, y se encuentra unido al antígeno F (Forcsmán), que es un ácido lipoteicoico. Siendo importante el papel de estos antígenos para inhibir a la N-acetil-muramyl-I-alanina amidasa, que es una autolisina, que controla la actividad autolítica de la bacteria. El dexosicolato induce a la lisis de la bacteria, siendo resistentes a la acción de esta enzima, cuando la colina componente de la pared celular es substituido por etanolamina. (20).

## 2.5. VARIACIONES GENOTIPICAS.

Streptococcus pneumoniae capsulado puede producir mutantes no capsulados, después de varias resiembras, perdiendo su especificidad de tipo como su virulencia. Esto se observa -- cuando las cepas capsuladas crecen en presencia de antisueros tipo específicos, las células capsuladas L son aglutinadas -- los anticuerpos anti L y de esta manera los mutantes poseen -- una ventaja selectiva.

Los tejidos de ratón vivo constituyen un medio de cultivo altamente selectivo, dado que al inocularse el Streptococcus pneumoniae del tipo R, son reemplazados por los Streptococcus pneumoniae del tipo L, estando en ventaja las cepas L, porque no pueden ser fagocitadas, debido a la cápsula, lo que ayuda a su multiplicación y en el caso de las cepas R, inmediatamente son fagocitadas por la ausencia de ella. (7, 20)

Otro tipo de variación genética es la transformación, fenómeno estudiado en 1928 por Griffith y posteriormente por -- Avery, Mc Lead y Mc Carty, demostrando el papel genético del DNA.

Las cepas de Streptococcus pneumoniae en su fase de crecimiento liberan un DNA transformante al medio de cultivo. -- El experimento llevado a cabo en ratones por Griffith, inyectándoles Streptococcus pneumoniae del tipo 2 sin cápsula, avirulentos junto con células de cepas del tipo 3 virulentas capsuladas muertas por calor, muriendo los ratones por la infección de estos animales infectados, los organismos vivos de el tipo 3 virulentos capsulados pudiendo ser aislados. (20)

## 2.6. FRECUENCIA Y SIGNIFICACION DE TIPOS SEROLOGICOS.

El 75% de los casos de neumonía neumocócica en el adulto son causados por nueve tipos. 1, 3, 4, 5, 8, 12, 14 y 18. Pero en los últimos cuarenta años la predominancia de los tipos han sido el 1, 2 y 3, en infecciones, con una distribución balanceada. El tipo 14 fue frecuente en niños, teniendo una relación antigénica de un polisacárido capsular con las sustancias de los grupos sanguíneos, y de esta reacción cruzada se produce una anemia hemolítica. (7,20)

En adultos los tipos más frecuentes son en este orden: 8, 4, 3, 1, 7 y 12. Los tipos serológicos que se han identificado en niños causando otitis media y neumonía bacteriana son: 19, 23, 14, 3, 6 y 1. El tipo 3 produce grande cápsula y habita en la faringe normal y es el de mayor mortalidad. (7,20)

De los reportes de varios países, los serotipos más frecuentes y el lugar donde se han encontrado, tenemos los siguientes: En Nueva Guinea: Se identifican 10 serotipos de la cepa PR, que son: 4, 6, 11, 14, 16, 19, 23, 34 y 35, de los cuales el serotipo 4 causa neumonía epidémica en los habitantes de la Isla, que a pesar de su ambiente tropical, padecen de infecciones respiratorias. (12, 13, 14)

En los Estados Unidos en 1973, en Chicago, fue hallado el tipo 23 por el Doctor H.M. Sommers aislado de sangre y líquido cefalorraquídeo en pacientes con meningitis. En Denver Colorado durante cuatro años de 1975 a 1979 se aislaron 98 cepas con resistencia a la penicilina, los serotipos fueron 3, 4, 6, 8, 9, 14 y 18, ocasionando mas problemas el tipo 4, en adultos y el tipo 6 en niños. El serotipo 9 L aislado en 1981 en un niño de año y medio con síndrome de Down que presentaba infección pulmonar, causándole la muerte por resistencia a varios antibióticos. (22) (23) (24) (28)

En Alberta, Canadá, en 1974 los serotipos encontrados en niños menores de 6 años, con resistencia a la penicilina son el tipo 9, 10, 6 y 19. (8) (9)

El serotipo hallado en Plimount, España en 1978 resistentes a 3 antimicrobianos, aislado de una paciente con infección aguda en la cara y con expectoraciones mucopurulentas. (26)

El serotipo 6A y 19A, hallados en Australia en 1977, aislado en pacientes pediátricos ocasionando bacteremias y teniendo múltiple resistencia a la penicilina. (19)

## 2.7. PATOGENICIDAD.

### PRODUCCION DE TOXINAS: NEUMOLISINA "O"

Streptococcus pneumoniae produce una toxina hemolítica - denominada neumolisina, misma que está inmunológicamente relacionada con la hemolisina oxigenolábil de Streptococcus hemolíticos, Clostridium tetani y Clostridium welchii. Esta toxina citolítica -SH/activada destruye las membranas celulares, liberando durante la autólisis una sustancia productora de lesiones purpúricas que producen hemorragia cutánea e interna al inyectarse en conejos, ocasionándoles anemia hemolítica esferocítica. (7) (20)

### NEUROAMINIDASA:

Es una enzima glicolítica producida en cultivos de Streptococcus pneumoniae. Esta neuroaminidasa es producida por un gran número de bacterias y mixovirus patógenos. La acción de esta enzima es sobre la membrana celular y fluidos del cuerpo sobre las glicoproteínas y sustratos glicolípidos, adheridas a la parte terminal del ácido-N-acetilneuramínico por un azúcar adyacente. Por lo que se ha observado bioquímicamente, siendo el responsable de la acción letal en el organismo. (20)



## 2.8. RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS.

Ehrlich descubrió que los microorganismos tienen la capacidad de desarrollar resistencia, frente a un antimicrobiano y se adaptan a vivir sin problemas. Este fenómeno sigue siendo un problema frente a infecciones producidas por Staphylococcus Mycobacterium y familia Enterobacteriaceae.

El término resistencia a los medicamentos se debe a cambios genotípicos, donde la población bacteriana vive después - de haber aplicado un antimicrobiano adaptándose, y sin cambios fenotípicos. Las cepas resistentes a un antibiótico pueden deberse a una infección con un plásmido (es decir, un bloque de genes accesorios no cromosómicos) o mutación y selección.

La expresión de una resistencia genotípica a los fármacos puede basarse en diversos mecanismos fenotípicos. La resistencia a un antibiótico, por parte de la bacteria puede depender de mecanismos distintos, en cepas de la misma especie.

Cambios fisiológicos (fenotípicos) causantes de la resistencia a los medicamentos.

1.- El aumento de la destrucción del medicamento es producido por un plásmido.

2.- La disminución en la actividad del medicamento. Se observa en cepas mutantes resistentes a sustancias como las purinas o pirimidinas (utilizando en la quimioterapia del cáncer), y son convertidos en nucleótidos antes de que actúen. En el caso de los medicamentos no sucede este mecanismo, porque no se alteran químicamente.

3.- La formación de un receptor alterado, que es un meca

nismo importante, donde hay una alteración de una proteína ribosómica específica, como consecuencia de una mutación simple que aumenta la resistencia (como en el caso de la estreptomicina).

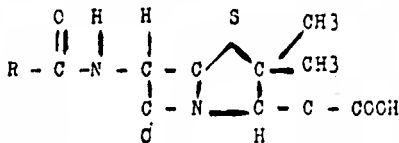
4.- Disminución de la permeabilidad. La baja permeabilidad es la responsable de una alta resistencia que limita el espectro antimicrobiano, perdiendo la proteína del transporte -- del aminoácido normal. La actinomicina inhibe la síntesis de RNA en muchos bacilos y cocos gram negativos. (7)

Las cepas resistentes aparecen en cultivos puros en forma de mutantes. Ciertas cepas resistentes, se producen en la naturaleza gracias a un mecanismo distinto capaz de dar resistencia a los antimicrobianos, mecanismo producido por una infección de la bacteria debido a un elemento genético extracromosómico llamado plásmido que determina la resistencia. Este factor que transferir resistencia, permite que se codifiquen - la síntesis de enzimas que inactivan al antibiótico. Tenemos por ejemplo la enzima penicilinasa, abriendo el anillo betalactam de la penicilina, esta resistencia es presentada por cepas de *Staphilococcus*. (7)

El plásmido DNA extracromosómico 2.0 mega dalton cryptic PDPI, aislado de cepas R36NC y RSF1010, de *Streptococcus pneumoniae*. El mecanismo por lo que el plásmido DNA es transferido de la cepa donadora a la cepa receptora, es similar a la conjugación. Los genes transferidos a *Streptococcus pneumoniae* e no capsulados ha presentado resistencia a cloramfenicol y tetraciclina. (13)

En Francia en el año de 1973 Dáng observó cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes al cloramfenicol. La cepa - - 6001 BM inactiva al cloramfenicol por la enzima acetil transferasa (éster acetico del cloramfenicol siendo su marcador un -- plásmido DNA. (5)

## 2.9. SUSCEPTIBILIDAD A LA PENICILINA.



Aunque fue descubierta hace varias décadas, la penicilina es todavía el antibiótico de elección contra un gran número de microorganismos infectantes. (10) (11)

Hay otras penicilinas naturales que difieren de la penicilina G por tener una cadena lateral que no es de bencilo. Algunas de ellas son penicilina F, dihidro F o amilpenicilina, además de penicilina K y X. Ninguno de estos compuestos naturales tiene ventaja sobre la penicilina G, algunos como la penicilina K, pueden ser menos eficaces en vivo debido al alto grado de fijación en las proteínas plasmáticas. (10) (11)

Los preparados de penicilina se valoran según su potencia inhibitoria del crecimiento empleando gérmenes de prueba como Bacillus subtilis o Staphylococcus. La actividad se expresa en unidades y se mide comparando con un preparado estándar a la zona de inhibición del crecimiento bacteriano sembrado en agar. La actividad representada por una unidad basta para impedir la multiplicación bacteriana.

Un miligramo de penicilina G representa mil seiscientos -

sesenta y siete unidades. Esto equivale a 0,6 microgramos de penicilina G. Los microorganismos inhibidos con menos de una unidad se consideran susceptibles.

Hansam y Bullen reportaron en 1967 en Nueva Guinea cepas relativamente resistentes a la penicilina con una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,1 a 2 microgramos por mililitro. (14)

Naraqui, en 1974, en Chicago Illinois, aisló de sangre y líquido cefalorraquídeo Streptococcus pneumoniae tipo 23 con una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,04 microgramos por mililitro. (28)

Dixon en Canadá en el año 1974 reportó cepas resistentes a la penicilina G con una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,2 a 0,32 microgramos por mililitro, siendo el grado de resistencia similar a las de las cepas de Nueva Guinea y Australia. (9)

Jones y Finland en el año de 1957 probaron ciento catorce cepas de Streptococcus pneumoniae a once antibióticos, donde su CIM fue alrededor de 0,04 microgramos por mililitro. (25)

Howes en Oxford, Estados Unidos, en el mismo año, aisló una cepa de Streptococcus pneumoniae de Líquido cefalorraquídeo donde la CIM a la penicilina fue de 0,31 a 0,62 unidades por milímetro (0,19 a 0,37 microgramos por mililitro). (16)

Lauer aisló en Colorado en el año 1975-79 cepas de - - Streptococcus pneumoniae donde su CIM a la penicilina G fue de 0,008 a 4 microgramos por mililitro. (22)

Parker en Plimount, España, en 1978 aisló cepas de Streptococcus pneumoniae resistentes al cloramfenicol y tetraciclina donde la CIM fue de 0,25 microgramos por mililitro. (26)

Istra, en Denver, Colorado, en el año de 1981 aisló en líquido cefalorraquídeo 101 cepas de Streptococcus pneumoniae, donde el 6.9% de los pacientes a los que se les aisló Streptococcus pneumoniae, estos mostraron relativa resistencia a la penicilina con una CIM de 0.12 a 1 microgramo por mililitro, el 2% de las cepas mostraron resistencia al cloramfenicol con una CIM de 16 microgramos por mililitro. (17).

### 3.0 MATERIAL Y METODO.

#### 3.1. PROCEDENCIA DE LAS CEPAS.

Las cepas de Streptococcus pneumoniae utilizadas para la realización de este estudio, se obtuvieron de muestras biológicas, remitidas al laboratorio de patología, en la Sección de Microbiología del Hospital Angel Leaño.

#### 3.2. METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA.

##### 3.2.1. RE AISLAMIENTO.

Las cepas que se obtuvieron en el primer aislamiento sospechosas de ser Streptococcus pneumoniae se les practicó Gram para demostrar que fueran diplococos Gram positivos con tendencia a agruparse en pares; posteriormente se efectuó la prueba de solubilidad en bilis para diferenciarlos de S. Viridans; éstas posteriormente se resembraron en agar sangre y se incubaron durante 24 horas en una atmósfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> para luego sometidas a identificación bioquímica definitiva y la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima a la penicilina.

##### 3.2.2. IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

1.- Colonias alfa hemolíticas sospechosas de ser Streptococcus pneumoniae en el primer aislamiento presentan una hemólisis alfa alrededor de la colonia, en medio agar sangre de carnero al 5%.

2.- Características coloniales de las cepas de Streptococcus pneumoniae, colonias redondas, aplanadas, brillantes, pigmentadas con un diámetro de 0,5 a 1,5 milímetros, en oca-

siones mucoides correspondiendo a organismos con mayor cápsula. También se pueden encontrar su centro deprimido por autólisis.

3.- Al microscopio mediante la tinción de Gram se observan cocos gram positivos lanceolados o agrupados en pares o cadenas cortas.

4.- La prueba de solubilidad en bilis o desoxicolato de sodio es positiva.

5.- Sensibilidad a la optoquina, prueba presuntiva para la identificación del Streptococcus pneumoniae, positiva con un halo de inhibición de 18 o más o más milímetros de diámetro.

### 3.2.3. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD.

La selección de un antibiótico para el tratamiento de infecciones bacterianas con frecuencia está supeditada al conocimiento de la susceptibilidad del germen infectante, misma que se determina mediante pruebas "in vitro".

Las pruebas de susceptibilidad "in vitro" miden la capacidad de un antibiótico para inhibir el desarrollo bacteriano. Estas pruebas se pueden hacer por procedimiento en difusión o dilución en agar.

El procedimiento en dilución en tubo, se efectúa diluyendo el antibiótico con una concentración conocida en los tubos e inoculando las bacterias en cantidad determinada de  $10^4$  a  $10^5$  por mililitro, se incuba 24 horas en atmósfera de  $CO_2$  observándose macroscópicamente el desarrollo bacteriano, donde la CIM es la mínima cantidad de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano.

Los factores que afectan la Concentración Inhibitoria Mínima son: el procedimiento empleado, estabilidad del antibiótico y producción de enzimas bacterianas capaces de alterar la actividad del antibiótico.

PASOS PARA EL METODO DE DILUCION:

1.- DILUCION BACTERIANA: Se tomaron 4 a 5 colonias de Streptococcus pneumoniae del agar sangre, y con ella se inoculó el caldo Muller Hinton y se incubó 24 horas en 37 grados centígrados, para obtener concentración de 1 por 10 a las 5 bacterias por mililitro.

2.- DILUCION DEL ANTIBIOTICO: Se pesaron 0,01 gramos del antibiótico (penicilina) y se diluyeron en 50 mililitros de solución salina estéril, resultando una concentración de 200 microgramos por mililitro, se añadió un mililitro al primer tubo haciendo diluciones progresivas en serie según el logaritmo de base 2, en volúmenes de un mililitro en cada uno de los 10 tubos con caldo Muller Hinton.

3.- El tubo número uno contuvo doble concentración de caldo Muller Hinton, con el objeto que al hacer las diluciones del antibiótico, disminuya a la mitad de su concentración de 200 microgramos por mililitro a 100 microgramos por mililitro en el primer tubo.

4.- Se añadieron 0,5 mililitros de la dilución  $1 \times 10^5$  bacterias por mililitro y se agrega esta cantidad a cada uno de los tubos con la dilución del antibiótico.

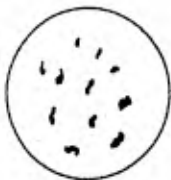
5.- Se agitan los tubos para mezclar el antibiótico y las bacterias. El último tubo se utiliza como control, ya que únicamente contiene bacterias sin antibiótico, por lo tanto va a tener crecimiento.



6.- Se incubaron 24 horas a 37° C, observando macroscópicamente el crecimiento por la turbidez y reportando la Concentración Mfñima Inhibitoria.

METODO DE DILUCION

1.- Dilución de las bacterias



4 a 5  
colonias

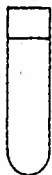
S. pneumoniae  
en agar sangre



7 ml  
caldo Mueller  
Hinten

$1 \times 10^5$  bacts/ml

2.- Dilución del antibiótico.

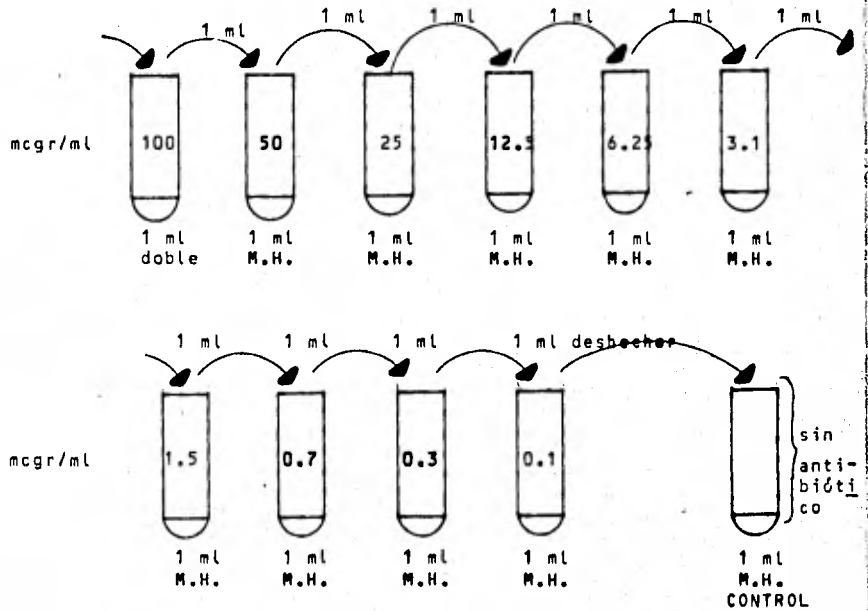


0,010 grms. penicilina  
50 cc solución salina

STOCK PENICILINA  
200 mcgrms/ml

1 ml se agrega al  
primer tubo

STOCK PENICILINA  
200 mcgr/ml



Agregar 0.5 ml de la suspensión bacteriana de  $1 \times 10^5$  bactc/ml a los 10 tubos y al control; agitar e incubar 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y observar.

#### 4.- RESULTADOS:

La susceptibilidad a la penicilina de las 50 cepas de -- Streptococcus pneumoniae por el método de dilución en tubo, re-  
velaron que un 4% de las cepas que correspondieron a la cepa -  
430 de secreción bronquial y la cepa 9 de secreción bronquial -  
con una Concentración Inhibitoria Mínima de 1.5 microgramos por  
mililitro; otro 4% de las cepas, que fueron la cepa 270 de ex-  
pectoración y la 406 de secreción ótica con una Concentración  
Inhibitoria Mínima de 0.3 microgramos por mililitro y el 92% -  
restante que correspondió a 46 cepas, donde no se observó el -  
desarrollo macroscópico en ninguno de los tubos; la Concentra-  
ción Inhibitoria Mínima fue mayor o igual a 0.1 microgramos --  
por mililitro.

Streptococcus Pneumoniae fue aislado de diferentes espe-  
címenes clínicos encontrándose con más frecuencia en 17 cepas  
de secreción ótica con un 34%, en las cepas de expectoración -  
con un 28%, en cepas de secreción nasal con un 12%, en 4 cepas  
de secreción bronquial con un 8%, en 3 cepas de secreción vagi-  
nal con un 6%, en 2 cepas de secreción oftálmica con un 4%, en  
una cepa de cultivo de orina con un 2%, y una cepa de tumora-  
ción con un 2%.

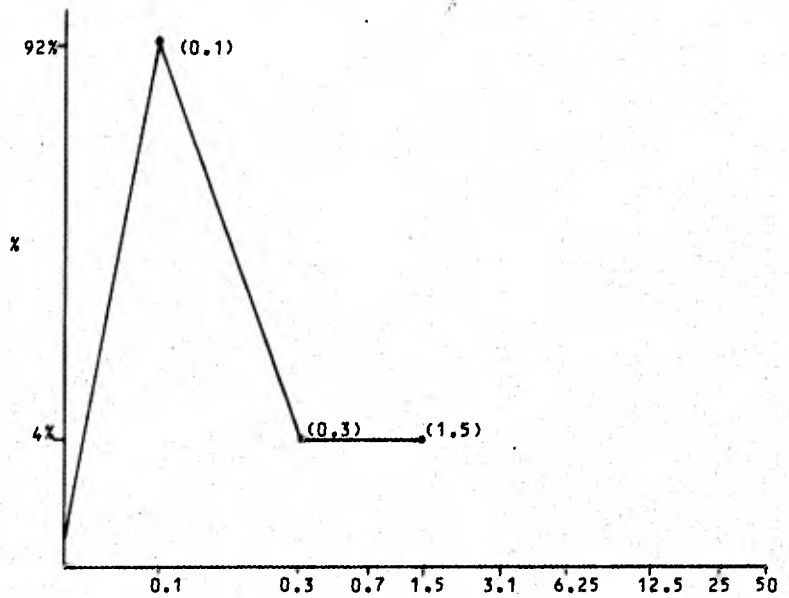
CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM) de 50 CEPAS  
DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE A LA PENICILINA.

No. DE CEPA	MUESTRA	OBTENCION DE LA CEPA	CONTROL	CIM mcg/ml
1	185	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
2	181	EXPECTORACION	POSITIVO	0
3	270	EXPECTORACION	POSITIVO	0.3
4	274	SECRECION NASAL	POSITIVO	0
5	230	EXUDADO FARINGEO	POSITIVO	0
6	406	SECRECION OTICA	POSITIVO	0.3
7	402	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
8	358	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
9	84	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
10	433	SECRECION NASAL	POSITIVO	0
11	145	EXPECTORACION	POSITIVO	0
12	436	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
13	194	SECRECION NASAL	POSITIVO	0
14	207	SECRECION NASAL	POSITIVO	0
15	243	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
16	312	SECRECION VAGINAL	POSITIVO	0
17	53	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
18	119	EXPECTORACION	POSITIVO	0
19	199	SEC. OIDO IZQUIERDO	POSITIVO	0
20	200	SEC. OIDO DERECHO	POSITIVO	0
21	201	SEC. OJO IZQUIERDO	POSITIVO	0
22	202	SEC. OJO DERECHO	POSITIVO	0
23	330	SEC. VAGINAL	POSITIVO	0
24	492	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
25	10	SECRECION BRONQUIAL	POSITIVA	0

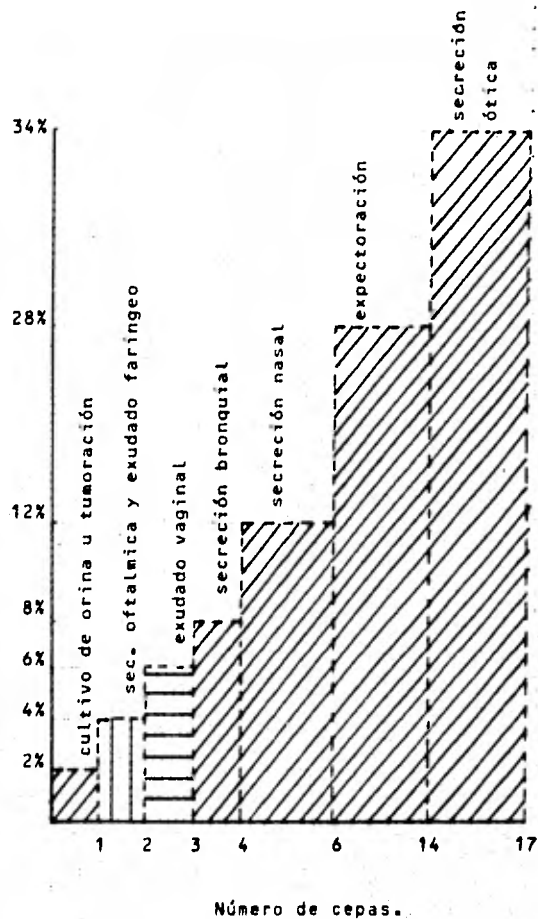
No. DE CEPA	MUESTRA	OBTENCION DE LA CEPA	CONTROL	CIM mcg/mL
26	75	EXPECTORACION	POSITIVO	0
27	89	MOCO NASAL	POSITIVO	0
28	216	TUMORACION	POSITIVA	0
29	1	EXUDADO FARINGEO	POSITIVO	0
30	285	CULTIVO NASAL	POSITIVO	0
31	25	SECRECION BRONQUIAL	POSITIVO	0
32	194	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
33	175	EXPECTORACION	POSITIVO	0
34	208	EXPECTORACION	POSITIVO	0
35	A	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
36	249	EXPECTORACION	POSITIVO	0
37	216	ORINA	POSITIVO	0
38	A	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
39	209	EXPECTORACION	POSITIVO	0
40	320	CULTIVO NASAL	POSITIVO	0
41	337	EXPECTORACION	POSITIVO	0
42	430	SEC. BRONQUIAL	POSITIVO	1.5
43	9	SEC. BRONQUIAL	POSITIVO	1.5
44	32	EXPECTORACION	POSITIVO	0
45	142	SEC. NASAL	POSITIVO	0
46	147	SECRECION OTICA	POSITIVO	0
47	105	EXPECTORACION	POSITIVO	0
48	114	EXPECTORACION	POSITIVO	0
49	P	EXPECTORACION	POSITIVO	0
50	162	SEC. VAGINAL	POSITIVO	0

La gráfica número 1 nos muestra los porcentajes de susceptibilidad de cepas de Streptococcus pneumoniae a la penicilina, con la Concentración Inhibitoria Mínima.

# cepas	% CIM	mcgr/ml
46	92	0.1
2	4	0.3
2	4	1.5



Microgramos por milimetro  
Concentración Inhibitoria Mínima



Gráfica 2% de frecuencia de cepas de Streptococcus pneumoniae aislado de especímenes clínicas.



## 5.- DISCUSION.

Las infecciones ocasionadas por cepas de Streptococcus pneumoniae aisladas de especímenes clínicos, eran combatidas efectivamente con penicilina; pero desde 1957 se empezaron a presentar cepas de Streptococcus pneumoniae con leve resistencia a la penicilina y fue cuando Jones y Finland comenzaron a realizar pruebas de susceptibilidad a las cepas de Streptococcus pneumoniae, obteniendo una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,04 microgramos por mililitro. (25)

De esta manera se iniciaron otras investigaciones, y en 1967 Hansman y Bullen en Nueva Guinea, aislaron 530 cepas de Streptococcus pneumoniae, que presentaron una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,1 a 2 microgramos por mililitro. (12)

En el año de 1974 Dixon en Alberta, Canadá, realizó pruebas de susceptibilidad a la penicilina a 600 cepas de Streptococcus pneumoniae, obteniendo una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,16 a 0,26 microgramos por mililitro; también en Dixon en 1976 aisló 143 cepas de Streptococcus pneumoniae con cuatro tipos capsulares que mostraron resistencia a la penicilina con una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,32 microgramos por mililitro (0,53 U/ml), aislados en su mayor parte de nasofaringe en niños menores de 6 años. (8)

En 1977 M. Tarpay en Oklahoma E.U.A. aisló 36 cepas de Streptococcus pneumoniae, seis de las cuales mostraron leve resistencia a la penicilina G, detectada por el método de dilución en tubo, las cepas de Streptococcus pneumoniae fueron aisladas de nasogaringe y secreciones de niños de 4 a 18 meses donde las cepas presentaron una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,2 a 0,39 microgramos por mililitro. (29)

De las investigaciones más recientes tenemos que en 1981 en Denver Colorado E.U.A., Istre aisló cepas de Streptococcus pneumoniae que mostraron una Concentración Inhibitoria Mínima de 0,12 a 1 microgramo por mililitro a la penicilina y una Concentración Inhibitoria Mínima de 16 microgramos por mililitro al cloramfenicol. (17)

De las investigaciones que se realizaron en el Hospital Angel Leaño y comparando con los reportes realizados en otras partes del mundo, de las 50 cepas de Streptococcus pneumoniae aislados de especímenes clínicos se les realizó la prueba de dilución en tubo obteniendo la Concentración Inhibitoria Mínima a la penicilina; solamente 4 cepas de las 50 aisladas tuvieron una Concentración Inhibitoria Mínima de 1.5 a 0.3 microgramos por mililitro con un 8%; un 4% que correspondió a dos cepas: la número 430 y 9 obtenida de secreción bronquial con una CIM de 1.5 microgramos por mililitro; el otro 4% correspondió a las cepas 270 de expectoración y la 406 de secreción ótica con una CIM de 0.3 microgramos por mililitro y las 46 restantes su Concentración Inhibitoria Mínima de mayor o igual a 0.1 microgramos por mililitro con un 92% como se muestra en la gráfica número uno.

Consideran que una cepa de S. pneumoniae es resistente a la penicilina cuando presenta una Concentración Inhibitoria Mínima de mayor o igual a 2 microgramos por mililitro.

Streptococcus pneumoniae fue aislado con mayor frecuencia como se muestra en la gráfica número 2 de secreción ótica con un 34% y las cepas de S. pneumoniae aisladas con menor frecuencia de especímenes clínicos fue de cultivo de orina y de tumoración con un 2%.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA** 39

## 6.- CONCLUSIONES:

La presente investigación tuvo por finalidad determinar la susceptibilidad a la penicilina a 50 cepas de Streptococcus pneumoniae aislados de especímenes clínicos en el Hospital Ángel Leaño, utilizando el método de dilución en tubo, obteniendo la Concentración Inhibitoria Mínima, la cual nos indica la resistencia o susceptibilidad a la penicilina.

De las 50 cepas de S. pneumoniae, 2 presentaron una Concentración Inhibitoria Mínima de 1.5 microgramos por mililitro con un 4% correspondiendo a las cepas 430 y 9 de secreción - - bronquial, otras 2 cepas presentaron una Concentración Inhibitoria Mínima de 0.3 microgramos por mililitro con un 4%, siendo las cepas 270 de expectoración y la 406 de secreción ótica y las 46 cepas restantes presentaron una Concentración Inhibitoria Mínima de 0.1 microgramos por mililitro con un 92%. Considerando una cepa de S. pneumoniae presenta resistencia a la penicilina cuando su Concentración Inhibitoria Mínima es mayor o igual a 2 microgramos por mililitro, por lo que la Concentración Inhibitoria Mínima obtenida en nuestra investigación fue menor a 2 microgramos por mililitro; de este modo las cepas de Streptococcus pneumoniae son susceptibles a la penicilina mostrando ser el antibiótico de elección.

7.- BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Bailey, W.R., and Scott E.G., Diagnostic Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Aregentina, Third Edittion, 1973, pp. 381-385.
- 2.- Campos J., Uso Adecuado de antimicrobianos, Jefe de Enseñanza e investigación del H.G.R. # 45.
- 3.- Converse III, M.G. and Dilton Jr. H.C., 1977, Epidemiological Studies of Streptococcus Pneumoniae in infants: Methods of isolating pneumococci. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 5, No.3, pp. 293-295
- 4.- Cowan. S.T. and Steel K.J. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica Compañía Editorial Continental; S.A., México, Segunda Edición, 1979, pp. 84-89.
- 5.- Dang Van A. And Et al., 1978, Cloraphenicol resistance in Streptococcus pneumoniae: Enzymatic Acetilation and posible Plasmid linkage. Antimicrobial Agents and Chemetherapy, Vol. 13, No. 4, pp. 557-583.
- 6.- Davidsohn J. and Henry J.B., Todd-Sanford Diagnóstico Clínico por el laboratorio. Salvat Editores, S.A., Barcelona España, sexta edición, 1978, pp. 985-991.
- 7.- Davis.B.D. and et al., Tratado de Microbiología. Salvat Editores, S.A., Barcelona España, Segunda Edición, 1978, pp. 168-169, 715-728.

- 8.- Dixon J.M.S., 1974. Pneumococcus with increased resistance to penicillin.  
The Lancet, pp. 474.
- 9.- Dixon J.M.S., and et al., 1977. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin.  
CMA Journal, vol. 117, pp. 1159-1161.
- 10.- Flores F. y Colaboradores, 1973. Antibióticos: La batalla más dura del siglo.  
Médico Moderno, Edición Especial.
- 11.- Goth A. Farmacología Médica, Nueva Editorial Interamericana, S.A., México, octava edición, 1977. pp. 482-486.
- 12.- Hansman D.G. and et al., 1973. Pneumococci with increased resistance to penicillin.  
British Medical Journal. pp. 405.
- 13.- Hansman D.G., 1976. Penicillin Intensive Pneumococci.  
British Medical Journal. pp. 1503-1504.
- 14.- Hansman D.G. and et al., 1971. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man.  
The New England Journal of Medicine, vol. 284, No.4, pp. 175-177.
- 15.- Holt J.G. and et al., The Sharter Berge's Manual of determinative Bacteriology.  
The Williams and Wilkins Company Baltimore, U.S.A. Eight Edition, 1977. pp. 184-193.
- 16.- Howes V.J. and Mitchell K.G., 1976. Meningitis due to relatively penicillin resistant pneumococcus.  
British Medical Journal. pp. 996.

- 17.- Istre R.G. and et al., 1953. Cloraphenicol and penicillin resistance in pneumococci isolated from blood and cerebrospinal fluid; a prevalence study in metropolitan Denver. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 17, No. 3, pp. 472-478.
- 18.- Jacobs M.R. and et al., 1979. Antimicrobial susceptibility testing of pneumococcus determinative of Kirby Bauer break points penicillin G, erythromycin and rifampicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 16, No. 18, pp. 190-197.
- 19.- Jacobs M.R. and et al., 1978. Emergence of Multiply resistant pneumococci. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 299, NO. 14, pp. 572-586.
- 20.- Joklik W.K. and et al., *Zinsser Microbiology*. Appleton-Lentury-Crofts, New York, 1980, 17th Edition, pp. 572-586.
- 21.- Lennette E.H. and et al., *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Third Edition. 1980 pp. 88, 110, 478, 479.
- 22.- Lauer A.B. and Reller J.B., 1980. Serotype and penicillin susceptibility of pneumococci isolated from blood. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. II, No.3, pp. 242-244.
- 23.- Lynn Cates K. and et al., 1978. A penicillin resistant pneumococcus. *The Journal of Pediatrics*, Vol. 93, No. 14, pp. 624-626.

- 24.- Paredes A. and et al., 1967. Prolonged pneumococcus meningitis due to an organism with increase resistance to penicillin.  
Pediatrics, Vol. 58, No. 3, pp. 378-381.
- 25.- Parker M.J., 1978. Multiple resistance pneumococcus.  
The Lancet. pp. 155-156.
- 26.- Phillips C., and et al., 1980. From the Center for disease control. Epidemiology of pneumococci serotype in USA, 1978-1979.  
The Journal of infections disease, Vol. 141, No.1, pp. 119-123.
- 27.- Sirus Naraqui M.D., 1974. Relapsing pneumococcal meningitis: Isolates of an organism with decreased susceptibility to penicillin G.  
The Journal of Pediatrics, Vol. 85, pp. 671-672.
- 28.- Tarpay M., 1978. Importance antimicrobial susceptibility testing of streptococcus pneumoniae.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 14, No. 4, pp. 628-629.