



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREVALENCIA DE RESISTENCIA A LA PENICILINA
Y ANTIBIOTICOS COMUNES EN
Streptococcus pneumoniae, 1995 - 2001.

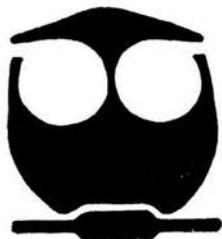
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA ELENA JIMENEZ MARTINEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado Asignado:

Presidente Prof. MARÍA DEL CARMEN CORTES DECUIR

Vocal Prof. ANTONIO CASTILLO DURAN

Secretario Prof. FRANCISCO QUIÑONES FALCONI

1er. Suplente Prof. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

2º. Suplente Prof. MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ALVAREZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER).

Asesor: McM Dr. FRANCISCO QUIÑONES FALCONI.

Sustentante: MARÍA ELENA JIMÉNEZ MARTÍNEZ.



Agradecimientos.

Al Dr. Francisco Quiñónez Falconi

*Por haber confiado en mi y darme la oportunidad de realizar
no sólo este proyecto. Por haber sido guía en este trabajo,
compartiendo conocimientos y experiencias*

Gracias.

A mis amigos y compañeros.

*Miriam Galicia, Alicia Rodríguez, Lina Larios,
Guadalupe Fiallega, Ma. Carmen García, Claudia Sánchez,
Patricia Reyes, Rosalba Lozoya, Fernando Morales,
Cecilia Cerón, Lourdes Infante y Patricia San Juan.
Por dejar en mi diversas experiencias y aprendizaje, a través
de su confianza y palabras de aliento en los momentos
más difíciles.*

Gracias

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptional.

NOMBRE: María Elena Jiménez

Martínez

FECHA: 27. mayo. 2004

FIRMA: Mallena

A mis Padres: Rubén y Ma. Elena.

Gracias por ser mis padres, por darme su apoyo y comprensión en todo momento. Por enseñarme que nada es fácil y que las cosas que más nos cuestan son las cosas que más se aprecian en la vida.

A mis hermanos.

Minerva, Berenice, Danae y Rubén.

Por compartir momentos de alegría y de tristeza.

Por ser un ejemplo a seguir.

Gracias.

ÍNDICE

CAPITULO 1

1. Introducción.	2
1.1. Planteamiento del problema.	2
1.2. Objetivos.	4
1.3. Hipótesis.	4
1.4. Criterios de inclusión.	5
1.5. Criterios de exclusión.	5

CAPITULO 2

2. Antecedentes.	7
2.1. Generalidades.	7
2.2. Epidemiología mundial de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	8
2.3. Epidemiología en México y Latinoamérica de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	10
2.4. Características de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	11
2.4.1. Características fisiológicas.	11
2.4.2. Características microscópicas y macroscópicas.	11
2.5. Identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	12
2.5.1. Sensibilidad a la optoquina.	12
2.5.2. Solubilidad en bilis.	12
2.6. Mecanismos de patogenicidad <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	13

2.7. Desarrollo de la resistencia antimicrobiana de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	15
2.8. Resistencia antimicrobiana de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en México y Latinoamérica.	19
2.9. Mecanismo de resistencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	20
CAPITULO 3	
3.1. Material	24
3.1.1. Microorganismos.	24
3.1.1.1. Aislamientos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	24
3.1.1.2. Capas de referencia.	24
3.1.2. Agentes antimicrobianos.	24
3.1.3. Medios de cultivo.	25
3.1.4. Reactivos.	25
3.1.5. Varios.	25
3.2. Método.	26
3.2.1. Recuperación de aislamientos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	26
3.2.2. Pruebas para la identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	26
3.2.2.1. Tinción de Gram.	26
3.2.2.2. Susceptibilidad a la optoquina.	27
3.2.2.3. Solubilidad en bilis.	28
3.2.3. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.	29
3.2.3.1. Preparación de soluciones madre.	28
3.2.3.2. Procedimiento para dilución en caldo.	29

3.2.3.3. Preparación del inóculo.	33
3.2.3.4. Inoculación de las placas.	33
3.2.3.5. Incubación.	33
3.3.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).	34
3.3.3.1. Valores de corte para la concentración inhibitoria mínima.	34
3.3.4. Procedimiento de control de calidad.	35
3.3.4.1. Cepas de referencia para el control de calidad.	35
3.3.4.2. Control del inóculo.	35
3.3.4.3. Control de crecimiento.	36
3.3.4.4. Control de esterilidad.	36
CAPITULO 4	
4. Resultados.	39
CAPITULO 5	
5. Discusión.	56
CAPITULO 6	
6. Conclusiones.	61
APÉNDICE.	
7.1. Preparación de soluciones madre.	63
7.2. Puntos de corte para <i>Streptococcus pneumoniae</i> y cepas de referencia.	66

7.3. Preparación de medios de cultivo.	68
7.4. Preparación de reactivos.	68
BIBLIOGRAFÍA.	71

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Planteamiento del Problema.

El *Streptococcus pneumoniae* es uno de los microorganismos más comunes en la patología infecciosa del ser humano, asociado con infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, así como de infecciones sistémicas graves, siendo causa importante de morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades, particularmente en niños, ancianos y en pacientes con enfermedades crónicas o enfermedades inmunosupresoras.

Debido a que el *Streptococcus pneumoniae* era un patógeno muy sensible a un gran número de antibióticos, siendo la penicilina el antibiótico de primera elección, las infecciones causadas por este microorganismo eran, en general, fácilmente erradicadas⁵⁸, aunque la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina se conoce desde los años 60's, la extrema peculiaridad de estas cepas r.o era cuestionable para el área clínica.

A partir de 1977 se ha descrito en muchos partes del mundo un incremento progresivo de la resistencia a penicilina de cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo la resistencia de este microorganismo no sólo se limita a la penicilina, pues se ha documentado el surgimiento de aislamientos resistentes a múltiples antibióticos, a demás de la penicilina, tales como cefalosporinas, macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, y trimetoprim/sulfametoxazol.¹⁴

El incremento de la multirresistencia antimicrobiana, ha ocasionado que el tratamiento empírico de infecciones causadas por este microorganismo se ha aún más desafiante, siendo en la actualidad un importante problema de salud mundial, lo cual implica que el área clínica deba conocer y mantenerse al tanto de los cambios en la prevalencia y el patrón de

susceptibilidad de los aislamientos resistentes en su comunidad, y usar estos datos para evaluar la selección de antibióticos de primera y segunda línea para cada tipo de infección por *Streptococcus pneumoniae*.

En México la información existente con relación a los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en *Streptococcus pneumoniae* es escasa y se ha señalado un incremento en la prevalencia de cepas resistentes a la penicilina en la población pediátrica. No obstante la información relacionada con infecciones en la población adulta e infecciones respiratorias serias no existe en nuestro medio, siendo esta información de relevancia desde el punto de vista clínico pues tiene implicaciones directas en la selección del antimicrobiano en pacientes gravemente enfermos.

Por lo que el presente estudio se realizó para definir la susceptibilidad a antibióticos de uso común a cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de pacientes con algún padecimiento asociado a infecciones de vías respiratorias, que acudieron al servicio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en un periodo de seis años; mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de microdilución en caldo, estableciendo con mayor precisión los niveles de resistencia según la concentración de antibiótico, proporcionándonos una mayor aproximación al grado de sensibilidad-resistencia antimicrobiana.²⁶

1.2 OBJETIVOS.

- ❖ Determinar la resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina y antibióticos de uso común en aislamientos respiratorios de pacientes que asistieron a la consulta en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- ❖ Determinar la susceptibilidad del *Streptococcus pneumoniae* a los antimicrobianos de uso común en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- ❖ Determinar el patrón de susceptibilidad del *Streptococcus pneumoniae* a diversos antimicrobianos de acuerdo a la susceptibilidad a penicilina.

1.3 HIPÓTESIS.

Ho: La susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae*, así como el patrón de susceptibilidad de acuerdo a la susceptibilidad a penicilina se ha mantenido sin cambios en los últimos seis años en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Ha: La susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae*, así como el patrón de susceptibilidad de acuerdo a la susceptibilidad a penicilina se ha incrementado en los últimos seis años en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

1.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- ❖ Aislamientos obtenidos de exudado nasal, exudado faringeo, expectoración, líquido pleural, lavado bronquiolo alveolar y hemocultivos de aquellos pacientes con el diagnóstico de una patología infecciosa.
- ❖ Aislamientos identificados como *Streptococcus pneumoniae*, de acuerdo a las siguientes pruebas: producción de α -hemólisis, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis.

1.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- ❖ Aislamientos repetidos del mismo paciente en un periodo mínimo de tres meses.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES.

2.1. GENERALIDADES.

El *Streptococcus pneumoniae*, fue identificado por primera vez en Francia en 1881 por Pasteur en la saliva de un paciente con rabia, nombrándolo *Microbe septice mique du salive* y de su propia saliva por Sternberg en Estados Unidos quien lo llamó *Micrococcus pasteurii*. En 1883 el término de *neumococo* fue utilizado por Friedlander y Talamon por la asociación de esta bacteria con la neumonía lobar, basándose en su apariencia en la tinción de Gram se le designó como *Diplococcus* en 1926, finalmente en 1974 fue nombrado como *Streptococcus pneumoniae*. A partir de 1915, la estructura química y la antigenicidad del polisacárido capsular neumocócico ha sido estudiada, creándose así la base del sistema de serotipificación, en la actualidad se han identificado más de 90 serotipos y 40 serogrupos.⁵⁸

La nasofaringe del hombre es el principal reservorio del *Streptococcus pneumoniae*, aislándose de un 5% a 70% de la población adulta sana. La fuente de transmisión es de persona-persona por medio de secreciones respiratorias. La infección neumocócica es precedida por colonización bacteriana de la mucosa nasofaríngea, donde la bacteria puede persistir como parte de la flora comensal sin causar enfermedad, flora compuesta por bacterias normalmente no patógenas, como estreptococos anaerobios y estreptococos aeróbicos α -hemolíticos. También, pueden encontrarse organismos patógenos, como *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.^{25, 63}

La presencia de *Streptococcus pneumoniae* en la nasofaringe de portadores asintomáticos es más común en niños que en adultos, variando de acuerdo a la región geográfica, edad,

época del año (otoño e invierno), diferencias genéticas y condiciones socio-económicas, tales como hacinamiento, higiene, tamaño de la familia, asistencia a guarderías y serotipo de la cepa colonizadora. La colonización generalmente dura entre 1 y 17 meses.

En la actualidad el *Streptococcus pneumoniae* es uno de los principales patógenos, que afectan fundamentalmente a la población pediátrica, adultos mayores de 65 años, y a pacientes con enfermedades crónicas o inmunosupresoras. Las infecciones de las vías respiratorias bajas (neumonía), tracto respiratorio superior (sinusitis), y canal auditivo (otitis media) constituyen la gran mayoría de infecciones causadas por este microorganismo. Aunque la enfermedad neumocócica severa (neumonía necrotizante, meningitis y bacteriemia) constituye un pequeño grupo de enfermedades, estas infecciones invasivas son responsables de gran parte de la mortalidad. Las complicaciones de una neumonía pueden ser el empiema, derrame pleural autolimitado o manifestaciones extrapulmonares.^{25, 33, 45, 44}

2.2. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL DE *Streptococcus pneumoniae*.

En países desarrollados y en vías de desarrollo, se considera al neumococo como un patógeno de importancia en neumonías infantiles, se estima que ocurren de 150 000 a 570 000 casos de neumonía neumocócica al año en los Estados Unidos, siendo letal para el 5% de los casos.³² Los neumococos son aislados aproximadamente en 18% de los casos de meningitis, de 26% a 53% en niños con otitis media y de 17% a 39% en adultos con neumonía que requieren hospitalización; por otra parte se estima que ocurren de 15 000 a

30 000 casos de bacteriemia neumocócica y meningitis entre personas mayores de 65 años en el norte de América cada año. En 1990, la mortalidad asociada a infecciones invasivas causadas por neumococos era de aproximadamente 20% entre pacientes mayores de 65 años de edad y 40% para mayores de 85 años.^{11,39,78}

En 1994 en países desarrollados, la incidencia anual de neumonía neumocócica fue de 5.9 millones de casos en menores de 5 años; 4.5 millones de casos en niños de 5 a 14 años; 9.3 millones de casos en el grupo de 15 a 59 años y 4.8 millones de casos en personas de más de 60 años. La letalidad alcanzó 40% en el grupo con edad inferior a los 5 años y 50% en las personas de más de 60 años. En el Reino Unido, cada año uno de cada 1 000 adultos contrae neumonía neumocócica, una de cada 200 personas en su mayoría niños menores de 1 año contrae meningitis y se notifican unos 7 casos de bacteriemia neumocócica por 100 000 habitantes. Entre 1981 y 1996 en el sur de Suecia, la incidencia de bacteriemia neumocócica era de 5.2 a 15.2 casos por cada 100 000 habitantes al año.

En Dinamarca, la incidencia de enfermedad neumocócica invasora ha aumentado más de 10 veces en las últimas dos décadas.²⁵ En un estudio realizado en 3 918 casos de meningitis bacteriana en Italia entre 1994 y 1998, el 23.4% fueron causados por neumococo encontrándose más elevada entre los lactantes y los niños de hasta 4 años de edad y en adultos mayores de 65 años.

En Gambia la frecuencia de enfermedad neumocócica es alta, principalmente en niños, y se estima entre un 60%-90% de infecciones del tracto respiratorio inferior en niños menores de 5 años, causadas por neumococo. Similar a lo reportado en algunas ciudades de África del sur, en donde la frecuencia puede ser de 100 casos por cada 1 000 habitantes.⁶²

2.3. EPIDEMIOLOGÍA DE *Streptococcus pneumoniae* EN MÉXICO Y LATINOAMÉRICA.

En México la neumonía adquirida en la comunidad puede alcanzar una cifra anual de 3 millones de casos, de los cuales se reportan aproximadamente 30 000 casos de muertes relacionadas con esta enfermedad, siendo uno de los agentes más importantes el *Streptococcus pneumoniae*.³² En 1984, la neumonía constituyó la segunda causa más común de mortalidad entre niños menores de 5 años (290.5 casos/ 1 000 casos en niños menores de 1 año y 17.2 casos/ 1 000 casos en niños de 1 a 4 años); alrededor de 50% de los casos presentaron neumonía de origen bacteriano, siendo el *Streptococcus pneumoniae* uno de los agentes etiológicos más comunes.⁷⁰ Durante 1994 – 1998, 50% de los casos de meningitis bacteriana ocurrió en niños entre los 3 meses y los 3 años de edad, con una mortalidad arriba de 10%.¹⁶ De 1986 a 1991 en el Instituto Nacional de Perinatología se reportaron 560 casos de sepsis neonatal, solo uno debido a *Streptococcus pneumoniae*.⁷⁴

En Latinoamérica, durante el periodo de 1993 a 1996 se realizó un estudio, con un total de 1 649 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, de los cuales se reportaron 817 pacientes con neumonía (50.4%), meningitis en 528 (32.5%), sepsis o bacteriemia en 182 (11.2%) y con otro diagnóstico en 94 pacientes (5.8%). En 1999 en Argentina se registraron 800 muertes por infección respiratoria aguda en niños menores de 5 años, siendo el 50% de los casos causadas por el *Streptococcus pneumoniae*, en este país las bacteriemias transitorias y la sepsis, en niños menores de 3 años, fuera del periodo neonatal, también fueron producidas predominantemente por *Streptococcus pneumoniae*.⁶⁷

2.4. CARACTERÍSTICAS DE *Streptococcus pneumoniae*.

2.4.1. Características Fisiológicas.

Los neumococos son microorganismos relativamente exigentes y su viabilidad se reduce si se permite que las muestras clínicas se des sequen a temperatura ambiente o se coloquen en solución fisiológica estéril, por lo que, estas deben de transportarse en caldos con nutrientes y procesarse de inmediato o almacenarse a 4° C hasta ser procesadas.

El *Streptococcus pneumoniae* es un microorganismo anaerobio facultativo, con requerimientos nutricionales complejos y sólo se desarrolla en medios enriquecidos como el soya-tripticaseína, infusión de cerebro-corazón, Mueller-Hinton, todos ellos suplementados con 5% de sangre desfibrinada de carnero, aunque puede crecer en sangre de caballo, conejo o humana. La sangre proporciona una enzima llamada catalasa, de la cual carecen los estreptococos y si no se aporta una fuente exógena de ésta, el crecimiento del microorganismo es destruido por la acumulación de peróxido de hidrógeno.

El pH óptimo para la proliferación del neumococo en medios de cultivo es de 7.4 a 7.8, a una temperatura de 35 a 37° C (puede variar de 25–42° C) y requiere de una concentración de 3 a 5% de CO₂ para su desarrollo en medios sólidos.^{4, 48, 57, 62, 72, 78, 80}

2.4.2. Características Microscópicas y Macroscópicas.

El *Streptococcus pneumoniae*, es un coco Gram positivo de forma lanceolada de 0.5 a 1.25 µm de diámetro, cuando se le observa en extendidos de expectoraciones y líquidos corporales pueden estar solos, en pares (diplococo) y en cadenas cortas. Luego de incubación prolongada, los microorganismos pueden parecer Gram negativos. No presenta

movilidad y no forma esporas. En agar sangre las colonias de *Streptococcus pneumoniae* son pequeñas de aproximadamente 1 a 5mm de diámetro, elevadas, brillantes, de bordes regulares, rodeadas por una zona de alfa hemólisis (coloración verdosa), los microorganismos densamente capsulados tienden a producir colonias mucoides. Los cultivos con 24 horas de incubación, presentan colonias con la porción central deprimida (colonias umbilicadas). Si la incubación excede de 72 horas, el resto del microorganismo se lisa espontáneamente, y sólo queda una depresión en el agar.^{4, 48, 62, 72, 78, 80}

2.5. IDENTIFICACIÓN DEL *Streptococcus pneumoniae*.

2.5.1. Sensibilidad a la Optoquina.

Es la prueba más utilizada para la identificación presuntiva de los neumococos, está ideada en primer lugar para diferenciarlos del *Streptococcus viridans*, ya que ambos producen α -hemólisis en agar sangre. La optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreína) es un derivado de la quinina que actúa al nivel de membrana celular, inhibiendo el desarrollo de los neumococos.^{4, 48, 57, 62, 72, 78, 80}

2.5.2. Solubilidad en Bilis.

Se basa en la presencia sólo en el *Streptococcus pneumoniae* de una enzima autolítica, llamada L-alanina-muramil-amidasa, la cual se activa en presencia de una solución al 10% de sales biliares como el taurocolato o desoxicolato de sodio, ocasionando la lisis del neumococo.^{4, 48, 57, 62, 72, 78, 80}

2.6. MECANISMO DE PATOGENICIDAD DEL *Streptococcus pneumoniae*.

La patogénesis de la infección neumocócica involucra una serie de interacciones entre los determinantes o factores de virulencia (los cuales están situados en su superficie como se muestra en la Figura 1) y la inmunidad del huésped. En la tabla 1 se describe el mecanismo de acción de los principales factores de virulencia.^{19, 29, 43, 56, 61, 75, 79}

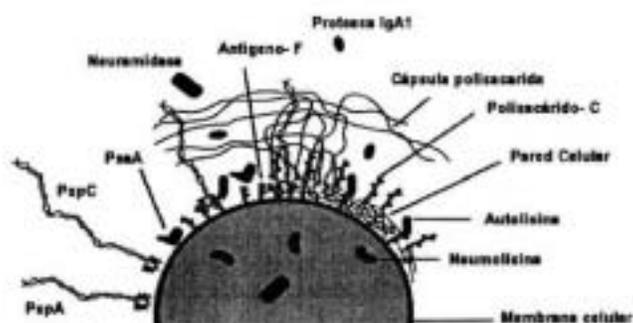


Figura 1. Representación hipotética de los principales componentes estructurales del *Streptococcus pneumoniae*.⁹

El *Streptococcus pneumoniae* entra en el tracto respiratorio superior de individuos sanos, uniéndose a las células epiteliales de la nasofaringe, la adhesión puede ser favorecida por anteriores infecciones virales. El estado inmune del huésped al momento de la colonización y la virulencia de la cepa, determina si el neumococo puede permanecer limitado a la nasofaringe o comenzar la invasión. El fracaso de las defensas específicas (anticuerpos, especialmente IgA) y no específicas como tcs, secreción de moco y el movimiento ciliar, en el tracto respiratorio puede facilitar el acceso del neumococo a bronquios y a pulmones. El daño de las células epiteliales por el peróxido de hidrógeno (producido por el neumococo), puede facilitar el acceso directo del neumococo a sangre, y de sangre a meninges.

Cabe mencionar que la libre proliferación del *Streptococcus pneumoniae* en el sitio de la infección no ocurre en individuos sanos. Los macrófagos alveolares e infiltrados polimorfo nucleares pueden eliminar a las bacterias siempre que el anticuerpo específico y el complemento estén presentes. Una vez digeridos y atrapados en un fagolisosoma, el neumococo es rápidamente eliminado.^{27,28}

Tabla 1. Principales Factores de Virulencia de *Streptococcus pneumoniae*.

Factor de Virulencia	Mecanismo de Virulencia.
Cápsula	Inhibe la fagocitosis, en ausencia de anticuerpos.
Pared Celular	Activa el proceso de inflamación. Activa la vía del complemento. Activa y recluta leucocitos polimorfo nucleares (PMN) en el sitio de inflamación.
Neumolisina	Inhibe el movimiento ciliar de células epiteliales. Inhibe la actividad bactericida de los PMN. Inhibe la proliferación de linfocitos. Inhibe la síntesis de anticuerpos.
PspA	Inhibe la activación del complemento.
Autolisina	Facilita la liberación de la neumolisina, produciendo lisis celular.
Neuraminidasa	Facilita la adherencia a células epiteliales y endoteliales.
Permeasas	Aumentan la adhesión.
H₂O₂	Daño pulmonar.
Proteasa IgA	Interfiere con las defensas del huésped.
Hialuronidasa	Enzima que degrada el ácido hialurónico.

2.7. DESARROLLO DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DEL *Streptococcus pneumoniae*.

Las primeras cepas de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia moderada a penicilina fueron identificadas en Boston en 1963. En Nueva Guinea y Australia en 1967, se reportó un neumococo con resistencia intermedia (CIM 0.1–1.0 µg/ml) y diez años después en Sudáfrica, se encontraron cepas con un alto nivel de resistencia a penicilina (CIM ≥ 2 µg/ml). La resistencia a penicilina se diseminó rápidamente a través del mundo en la década de los 80's (figura 2), principalmente en Sudáfrica, España, Hungría, Asia, Checoslovaquia, Estados Unidos, Australia y otros países de Europa. A partir de ese momento se describe en numerosos países un incremento progresivo de la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a este antibiótico, tabla 2.^{1,2,6}

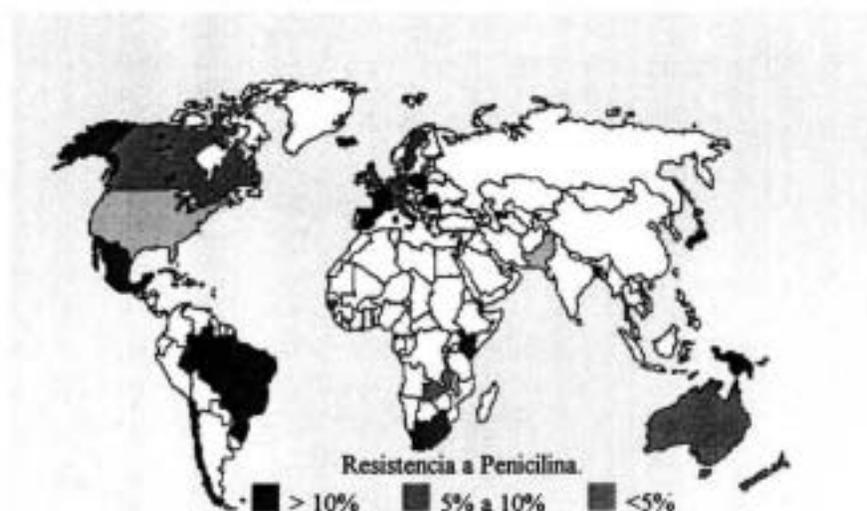


Figura 2. Prevalencia y Distribución Mundial de *Streptococcus pneumoniae* Resistente a Penicilina.¹

Tabla 2. Porcentaje de Resistencia a Penicilina de *Streptococcus pneumoniae*.

País	Año	Número de Aislamientos	Resistencia (%)	Referencia
África	1988	1034	7.9	1, 7, 49
	1989	960	16.3	
	1990	918	14.1	
	1996-1997	375	30.4	
Asia-pacífico	1997-1998	8252	17.8	36
Taiwán	1998-1999	276	25	65
Europa	1997-1998	8252	10.4	36
Hungría	1988-1989	135	58	78
España	1988-1989	139	42.5	78, 27
	1990	1492	40	
	1996-1997		36.5	
Francia	1984		0.5	78
	1995		36.3%	
Estados Unidos	1987	5459	5	1, 36
	1991-1992	544	6.6	5, 8, 24
	1997-1998	8252	14	24, 68
	1998-1999	4296	14.7	
Canadá	1988-1993		2.4	1, 36, 40
	1997-1998		13.9	

La primera cepa multirresistente de *Streptococcus pneumoniae* fue aislada en 1977 en Sudáfrica, presentando resistencia a penicilina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol; posteriormente la alta prevalencia de éste organismo fue documentada en España. A partir de esta fecha la resistencia se ha desarrollado a una velocidad constante, hasta finales de los 90's, cuando se reporta un incremento alarmante de resistencia

Tabla 3. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a Antibióticos No β -lactámicos.

País	Año	Número de Aislamientos	Resistencia (%)	Antibiótico	Referencia
África	1996-1997	375	38.3	Tetraciclina	1, 2, 78
			28	Eritromicina	
			36.4	Trim/sulfa	
Arabia Saudita	1990	358	70	Tetraciclina	36,78
Asia-pacífico	1997-1999	8252	41.7	Tetraciclina	36
			38.6	Eritromicina	
			27.3	Trim/sulfa	
			29.1	Cefuroxima	
Taiwán	1998-1999	276	89	Eritromicina	65
			32	Trim/sulfa	
			51	Cefuroxima	

Tabla 3. Continuación.

País	Año	Número de Aislamientos	Resistencia (%)	Antibiótico	Referencia	
Europa	1997-1999	8252	24	Tetraciclina	36	
			20.4	Eritromicina		
			15.2	Trim/sulfa		
			16.6	Cefuroxima		
Hungría	1988-89	135	66.5	Tetraciclina	78	
			48.5	Eritromicina		
			39.7	Trim/sulfa		
España	1988-1989	139	48.2	Tetraciclina	27	
			23	Cloranfenicol		
Canadá	1997-1998	8252	10.4	Eritromicina	15, 40	
	1997-1999	8252	14.4	Trim/sulfa		
Estados Unidos	1994-1995	1211	10.2	Eritromicina	1, 36,	
	1997-1998	1601	13.2	Tetraciclina	5, 8, 24	
			14.9	Ceftriaxona	27, 40, 68	
			20.6	Eritromicina		
	1997-1999	8252	2950	13.8	Trim/sulfa	
			1601	23.3	Cefuroxima	
			12	Tetraciclina		
			21.8	Cefuroxima		
	1998-1999	4296	23.2	Claritromicina		
			27.3	Trim/sulfa		

Trim/sulfa: Trimetoprim/sulfametoxazol.

2.8. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Streptococcus pneumoniae* EN MÉXICO Y LATINOAMÉRICA.

En México, las primeras cepas de *Streptococcus pneumoniae* con sensibilidad disminuida a penicilina (7.5%), con una concentración inhibitoria mínima de 1.25-2µg/ml fueron reportadas a principios de 1981 en niños sanos de guardería por Guiscafré y et.al.¹⁴ Posteriormente Calderón y et.al. , publicaron en 1993 un 21.6% de resistencia a penicilina en cepas de neumococo predominantemente de niños portadores y en menor grado hospitalizados.¹³ En este mismo año es realizado un estudio de vigilancia nacional, evaluándose neumococos aislados principalmente de líquido pleural y aspirado bronquial de niños hospitalizados; encontrando una resistencia del 20% a penicilina, 13% a eritromicina y 43% a cloranfenicol.¹² En el Hospital Infantil de México Federico Gómez de la Ciudad de México, se analizaron un total de 88 cepas de neumococo aisladas de 1991 a 1994, hallando el 44.31% de resistencia a penicilina, 17.24% a cefaclor, 14.8% a cefuroxima, 1.3% a ceftriaxona, 7% a eritromicina, 56% a trimetoprim/sulfametoazol y 15.9% a cloranfenicol.⁷⁷ En 1994 en una población rural del estado de Tlaxcala, México se reportó el 3% de resistencia elevada y 2% de resistencia intermedia a penicilina; 4% a amoxicilina/ácido clavulánico y a cloranfenicol, 42% a trimetoprim/sulfametoazol y 6% a eritromicina.⁵⁵ Más tarde se reportó el 18.4% de resistencia intermedia y 10.5% resistencia elevada a penicilina en niños con meningitis neumocócica; 2.6% a cefalosporinas de tercera generación, 7.8% a cloranfenicol y 18.4% a macrólidos.³⁰ De 1995 a 1999 se realizó un estudio prospectivo en el que participaron 49 niños con infección neumocócica invasiva severa, reportándose el 51% de cepas resistentes a penicilina.³¹

Entre 1993 y 1996, se analizó la resistencia a penicilina de *Streptococcus pneumoniae* en varios países de Latinoamérica, reportando una incidencia del 23.2% en la Ciudad de México.⁴¹ En 1998 el Sistema Regional de Vacunación (SIREVA) analizó 1 649 cepas de neumococo aisladas de niños latinoamericanos encontrando el 24.9% de sensibilidad y el 25.0% de resistencia a penicilina; con una resistencia a penicilina del 22.3% en Brasil, 49.4% en México, 35.5% en Argentina, 20.1% en Colombia y 42.9% en Uruguay.^{3, 22, 37, 46.}

⁴⁷ En Colombia se reportó el 12% de sensibilidad a penicilina de un total de 119 aislamientos, obtenidos durante 1994–1996, 2.8% presentaron resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol, 15% a cloramfenicol y 9.6% a eritromicina, observando aislamientos multirresistentes (penicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol).⁶²

2.9. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Streptococcus pneumoniae*.

Los mecanismos de resistencia surgen como un proceso de adaptación natural de los microorganismos a la acción inhibitoria o letal de los antimicrobianos o bien puede ser una característica intrínseca de estos. Los microorganismos pueden llegar a ser resistentes a los antimicrobianos, por cambios genéticos que involucran ya sea al DNA cromosomal, como la mutación, o por la adquisición de material genético extracromosomal, por transducción, transformación o conjugación.^{18, 73}

La adquisición de genes de resistencia puede llevarse a cabo por medio de plásmidos o transposones que son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia.

Los cambios genéticos producidos dan lugar a diversos tipos de alteraciones bioquímicas en el metabolismo bacteriano, las cuales pueden ser de tres tipos: ^{18, 73}

- A. Inactivación o modificación enzimática. Mediante la producción de enzimas específicas que hidrolizan al antibiótico o modificación de su estructura química. Las enzimas implicadas en este mecanismo de resistencia pueden ser hidrolasas, fosfotransferasas, adeniltransferasas y acetilasas.
- B. Barreras de permeabilidad:
- Disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula.
 - Eflujo activo, debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas, alterándose así la producción de energía, ocasionando no sólo disminución en la entrada de antibiótico, sino que a su vez reducen la concentración del antibiótico en la bacteria y se promueve la extracción activa del mismo.
- C. Alteración de sitio blanco. En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad ribosomales (50s, 30s), etc., afectando la afinidad por el antibiótico.

Existen varios mecanismos de resistencia, en el caso específico del neumococo, siendo el de mayor importancia, el mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos, debido a alteraciones múltiples en la estructura y función de las proteínas de unión a penicilina, PBP (por sus siglas en inglés), las cuales son enzimas de membrana que catalizan la síntesis de la pared celular bacteriana, capaces de unirse con la penicilina y su sitio activo. Se han identificado seis PBP's: *pbp 1a*, *pbp 1b*, *pbp 2a*, *pbp 2b*, *pbp 2x* y *pbp 3*.^{10, 72, 78} La resistencia antimicrobiana de este microorganismo es trascendente e incluye resistencia a

macrólidos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, inhibidores de la síntesis de folatos y tetraciclinas, como se resume en la tabla 4.^{17, 21, 51, 69, 71, 76}

Tabla 4. Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae*.⁶⁴⁻⁶⁹

ANTIBIÓTICO	GEN	MECANISMO DE RESISTENCIA
Penicilina	<i>pbp1a, pbp2x</i> <i>pbp2b</i>	Alteración del blanco debido a mutaciones
Cefaclor Cefuroxima Ceftriaxona	<i>pbp1a, pbp2x</i>	Alteración de las PBP's debido a mutaciones
Ciprofloxacina Gatifloxacina Levofloxacina Ofloxacina	<i>parC</i> y <i>parE</i> , <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i>	Alteración del blanco y modificación del sistema de transporte
Claritromicina Eritromicina	<i>mefE</i> , <i>ermAM</i>	Modificación del blanco, Alteración del sistema de transporte
Cloranfenicol	<i>cat</i>	Modificación del sistema de transporte y actividad enzimática
Tetraciclina	<i>tetM, tetO</i>	Modificación del sistema de transporte
Trimetoprim	<i>dhfr</i>	Alteración del blanco
Sulfametoxazol	<i>dhps</i>	Alteración del blanco

CAPÍTULO 3

3.1 MATERIAL.

3.1.1 MICROORGANISMOS.

3.1.1.1 Aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, fueron obtenidas de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), de 1995-2001, las cuales se encontraban almacenadas en leche descremada a una temperatura de -70°C.

3.1.1.2 Cepas de referencia:

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
- *Escherichia coli* ATCC 35218.

3.1.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS.

a) **Sales.** Los antibióticos empleados fueron obtenidos de diferentes laboratorios farmacéuticos de la Ciudad de México: penicilina (Fersinsa Gists-brocades); amoxicilina, ácido clavulánico y cefuroxima (Glaxo-SmithKline); cefaclor (Eli Lilly); ceftriaxona, trimetoprim y sulfametoxazol (Roche); eritromicina y claritromicina (Abbott); levofloxacina y ofloxacina (Cilag), ciprofloxacina y gatifloxacina (Bristol-Myers.Squibb). tetraciclina y cloranfenicol.

b) **Sensidiscos.**

- Taxo p de 5 µg/ml (clorhidrato de etilhidrocupreina) de BBL.

3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO.

- Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con sangre lisada de caballo al 3% (medio de cultivo casero, ver Apéndice).
- Placas de agar Mueller-Hinton con sangre de carnero al 5 % (BBL).

3.1.4 REACTIVOS.

- Equipo para tinción de Gram.
- Desoxicolato de sodio al 10%.
- Solución salina al 0.45%.
- Solución stock de Calcio (10 mg Ca^{2+}/l).
- Solución stock de Magnesio (10 mg Mg^{2+}/l).
- Buffer de fosfatos pH 6 y pH 6.5.

3.1.5 VARIOS.

- Placas de microdilución estériles con 96 pocillos redondos.
- Plástico autoadherible.
- Puntas universales estériles para micropipeta.
- Micropipeta multicanal 30 – 300 μl .*
- Micropipeta 5 – 40 μl .*
- Contenedores de plástico estériles.

*para soluciones acuosas.

3.2. MÉTODO.

3.2.1. RECUPERACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Streptococcus pneumoniae*.

- a) Las cepas a evaluar de *Streptococcus pneumoniae*, así como las cepas de referencia se encontraban almacenadas a una temperatura de -70°C .
- b) Cada una de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y de referencia fueron descongeladas a temperatura ambiente.
- c) Las cepas se inocularon en placas de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de carnero al 5%, con la finalidad de comprobar su viabilidad y pureza.
- d) Las placas inoculadas fueron incubadas de 18 a 20 horas a una temperatura de 35°C a 37°C en presencia de 5% CO_2 .
- e) Las cepas fueron subcultivadas dos veces antes de realizar las pruebas de susceptibilidad.
- f) La identificación de los aislamientos se llevó a cabo de acuerdo a la tinción de Gram, morfología colonial, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis.

3.2.2. PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*.

3.2.2.1. Tinción de Gram.

- a) A partir de una sola colonia del microorganismo (cultivo de 10 – 24 horas) se realizó un frotis, permitiendo que este se seque al aire para ser fijado a la flama.

- b) La preparación fue cubierta con cristal violeta, dejando actuar durante 1 minuto, posteriormente lavado con agua corriente.
- c) Se adicionó lugol a la preparación dejando actuar durante 1 minuto, el exceso de reactivo fue eliminado y lavado con agua.
- d) La decoloración se llevó a cabo con alcohol-acetona, tan pronto como las gotas de esta solución ya no arrastraron color, se lavo con agua.
- e) Finalmente se cubrió con safranina, después de 1 minuto, se lavó con agua dejando secar al aire. Se observó al microscopio a 1000X, observando cocos Gram, positivos, lanceolados, y en algunas ocasiones capsulados.

3.2.2.2. Susceptibilidad a la Optoquina.

- a) A partir de un cultivo puro de 18 a 20 horas, se tomó con el asa bacteriológica una sola colonia, Inoculando la colonia en una placa de agar Mueller-Hinton suplementada con sangre de carnero al 5%, en los cuatro sentidos.
- b) Con unas pinzas pasadas por la flama, se colocó un disco de optoquina de 6mm con una concentración de 0.5 µg, en el centro de la placa estriada y aplicando una suave presión al disco para ser adherido a la superficie de la placa.
- c) La placa fue incubada de forma invertida de 18 a 24 horas a 37°C, en presencia de CO₂ al 5%.
- d) Interpretación. Se consideró sensible al presentar un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco. El tamaño de la zona de inhibición que mostró el *Streptococcus pneumoniae* fue ≥15 mm de diámetro, con límites bien definidos.

3.2.2.3. Solubilidad en Bilis.

La prueba de solubilidad en bilis puede ser realizada por el método en tubo o por el método en placa (prueba rápida de Hawn y Beebe). Cabe mencionar que esta prueba ha sido sustituida, casi por completo, por la prueba de sensibilidad a la optoquina.

I. Método en tubo.

- a) La prueba se realizó a partir de un cultivo puro de 24 horas del probable neumococo, en caldo BHI o bien se puede preparar una suspensión en solución salina de un cultivo puro en agar sangre de 18 a 20 horas.
- b) En dos tubos de 12 x 75 mm, uno marcado como prueba y otro como control, se traspasaron 0.5 ml del cultivo bacteriano.
- c) Al tubo marcado como prueba se le adicionó 0.5 ml de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control 0.5 ml de solución salina.
- d) Ambos tubos fueron incubados a 37°C durante 3 horas.
- e) La lectura de la prueba se realizó, considerando como positiva cuando el contenido del tubo se aclara por completo (pierde su turbiedad original) y como negativa cuando la suspensión se mantiene turbia, igual que el control.

II. Método en placa o prueba rápida.

- a) Cultivo puro de 18 a 20 horas, en agar sangre de carnero al 5%, de probable *Streptococcus pneumoniae*.
- b) Se Adicionó 0.5ml de solución de desoxicolato de sodio al 2.0%, directamente sobre el cultivo. Sin invertir la placa, esta fue incubada a 37°C durante 30 min.

- c) Interpretación. Las colonias solubles en bilis se desintegran, dejando un área parcialmente hemolisada en el medio de cultivo donde se encontraban las colonias.

3.2.3. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de microdilución en caldo, de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité Nacional de Estándares para el Laboratorio Clínico de los Estados Unidos, NCCLS (por sus siglas en inglés).^{38, 42, 44, 54, 59}

3.2.3.1. Preparación de las Soluciones Madre.

Las soluciones madre o stock de cada uno de los antibióticos fueron preparadas de acuerdo a las recomendaciones señaladas por la NCCLS (ver Apéndice). Las soluciones de cada uno de los antibióticos se prepararon a las siguientes concentraciones: penicilina, cefaclor, cefuroxima, ceftriaxona y tetraciclina de 256µl/ml; amoxicilina con ácido clavulánico de 128/64µl/ml; eritromicina, claritromicina, levofloxacin y ofloxacin de 128µl/ml; cloranfenicol de 64µl/ml; gatifloxacin de 32µl/ml; ciprofloxacina de 8µl/ml y trimetoprim con sulfametoxazol de 128/2432µl/ml.

3.2.3.2. Procedimiento para Dilución en Caldo.

- a) Para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, se emplearon placas de microdilución estériles con 96 pocillos redondos

- b) Cada uno de los pocillos fue llenado con 50µl de caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 3% de sangre lisada de caballo.
- c) Para la sensibilización de las placas de microdilución, se adicionaron 50 µl de la solución madre del antibiótico a todos los pocillos de las columnas 1 y 2.
- d) A partir de la columna 2 se mezcló la solución del antibiótico perfectamente, para comenzar a realizar las diluciones correspondientes.
- e) Se transfirieron consecutivamente 50 µl de columna 2 a la columna 11, y de esta última a la columna 2 de la segunda placa de microdilución, hasta finalizar en la columna 6, los 50 µl restantes de esta columna fueron desechados.
- f) La columna 1 se empleó como control negativo y la columna 12 como control de crecimiento
- g) Un total de 15 dobles diluciones se obtuvieron para cada uno de los antibióticos evaluados, concentraciones que se muestran ejemplificadas en las figuras 1 y 2.
- h) Las placas de microdilución llenas fueron envueltas con plástico autoadherible y puestas a inmediatamente en un congelador a -20°C .

Figura 1. Representación esquemática de las concentraciones utilizadas para ocho de los antibióticos valuados en la determinación de la susceptibilidad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PE	C O N T R O L	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	C O N T R O L
AMC		$32/16$	$16/8$	$8/4$	$4/2$	$2/1$	$1/0.5$	$0.5/0.25$	$0.25/0.12$	$0.12/0.062$	$0.06/0.03$	
CEC		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	
CXM		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	
CRO		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	
TE		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	
C		16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.062	0.03	
STX		$32/608$	$16/304$	$8/152$	$4/76$	$2/38$	$1/19$	$0.5/9.5$	$0.25/4.75$	$0.12/2.37$	$0.06/1.18$	

Penicilina (PE), Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), Cefaclor (CEC), Cefuroxima (CXM), Ceftriaxona (CRO), Tetraciclina (TE), Cloranfenicol (C), Trimetoprim/sulfametoxazol (STX).

Figura 1. Continuación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PE	C O N T R O L	0.06	0.03	0.016	0.008	0.004						C O N T R O L
AMC		$0.03/0.016$	$0.016/0.008$	$0.008/0.004$	$0.004/0.002$	$0.002/0.001$						
CEC		0.06	0.03	0.016	0.008	0.004						
CXM		0.06	0.03	0.016	0.008	0.004						
CRO		0.06	0.03	0.016	0.008	0.004						
TE		0.06	0.03	0.016	0.008	0.004						
C		0.016	0.008	0.004	0.002	0.001						
STX		$0.03/0.59$	$0.016/0.29$	$0.008/0.14$	$0.004/0.074$	$0.002/0.037$						

Penicilina (PE), Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), Cefaclor (CEC), Cefuroxima (CXM), Ceftriaxona (CRO), Tetraciclina (TE), Cloranfenicol (C), Trimetoprim/sulfametoxazol (STX).

Figura 2. Figura 1. Representación esquemática de las concentraciones utilizadas para seis de los antibióticos valuados en la determinación de la susceptibilidad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CIP	C O N T R O L	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.0016	0.008	0.004	C O N T R O L
LVX		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	
OFX		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	
GAT		8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.016	
E		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	
CLR		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	
	N E G A T I V O											P O S I T I V O

Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LVX), Ofloxacina (OFX), Gatifloxacina (GAT), Eritromicina (E), Claritromicina (CLR).

Figura 2. Continuación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CIP	C O N T R O L	0.002	0.001	0.0005	0.0025	0.00012						C O N T R O L
LVX		0.03	0.016	0.008	0.004	0.002						
OFX		0.03	0.016	0.008	0.004	0.002						
GAT		0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005						
E		0.03	0.016	0.008	0.004	0.002						
CLR		0.03	0.016	0.008	0.004	0.002						
	N E G A T I V O											P O S I T I V O

Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LVX), Ofloxacina (OFX), Gatifloxacina (GAT), Eritromicina (E), Claritromicina (CLR).

3.2.3.3. Preparación del Inóculo.

- La suspensión del microorganismo fue preparada en 4ml de solución salina al 0.45%, tomando colonias directamente de un cultivo fresco de 18 a 20 horas.
- La suspensión se ajustó cuidadosamente a una turbidez equivalente a 0.5 de MacFarland para obtener una concentración del microorganismo aproximada de 1 a 2×10^8 UFC/ml
- Se tomaron 400 μ l de la suspensión de 0.5 MacFarland y se diluyeron en 10 ml de caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 3% sangre lisada de caballo, para obtener una concentración de 10^7 UFC/ml.

3.2.3.4. Inoculación de las Placas.

- Las placas sensibilizadas con el antibiótico a utilizar, fueron descongeladas a temperatura ambiente y se inocularon dentro de un periodo no mayor de 15 minutos después de haber preparado y diluido la suspensión del inóculo.
- Se inocularon todos los pocillos de la columna 2 a la columna 12 de las placas de microdilución con 50 μ l de la dilución del inóculo, teniendo finalmente una concentración del microorganismo de 5×10^5 UFC/ml, en cada uno de los pocillos.
- Las pruebas de susceptibilidad para cada cepa de *Streptococcus pneumoniae* y de referencia se realizó por duplicado.

3.2.3.5. Incubación.

- Las placas inoculadas fueron puestas una sobre otra por no más de un alto de cuatro placas (para asegurar que la temperatura de incubación sea la misma para todos los

cultivos) y envueltas con plástico autoadherible para evitar que las placas se resequen.

- Las placas se incubaron en una cámara humidificada de 20 a 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis.

3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.

- La lectura de las placas se realizó observando el fondo de las estas sobre un lector con espejo.
- El punto de corte se determinó, comparando la cantidad de crecimiento en el pocillo (un botón ≥ 2 mm o definida turbidez) con la cantidad de crecimiento en el control de crecimiento positivo utilizado en cada prueba.
- La menor concentración de antibiótico, en la cual no se detecta crecimiento o turbidez (igualando al control negativo) a simple vista, se designo como CIM (Concentración Inhibitoria Mínima).

3.3.3.1. Valores de Corte para la Concentración Inhibitoria Mínima.

La interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) como sensible, intermedio o resistente se obtuvo comparando los resultados obtenidos con los valores de las tablas publicadas por la NCCLS para *Streptococcus pneumoniae*.⁶⁰

Las tablas para la interpretación de los valores de corte se presentan en el Apéndice, así como las tablas para las cepas de referencia utilizadas.

3.3.4. PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD.

El propósito del control de calidad, fue el de evaluar la precisión y exactitud en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana; así como el de verificar el funcionamiento adecuado de los reactivos utilizados (medio de cultivo y antibióticos).^{59,38}

3.3.4.1. Cepa de Referencia para el Control de Calidad.

Las cepas de referencia utilizadas para el control de calidad fueron:

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 para evaluar la precisión y exactitud de las pruebas de diluciones de los antibióticos utilizados.
- *Escherichia coli* ATCC 35218 para evaluar la combinación de β -lactámico/ inhibidores de β -lactámase (amoxicilina/ ácido clavulánico).
- Ambas cepas de referencia fueron incluidas cada vez que se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
- Las cepas de referencia se encontraban congeladas a una temperatura de -70°C , se recuperaron de la misma forma que las cepas a evaluar, además para conservarlas viables, estas fueron subcultivadas semanalmente, siendo reemplazadas cada mes con cultivos que se encontraban congelados a -70°C .

3.3.4.2. Control del Inóculo.

Los recuentos de colonias se realizaron periódicamente para asegurar que McFarland de 0.5 y que los procedimientos para estandarizar y diluir el inóculo están bajo control; así como para verificar la pureza de la cepa a evaluar.⁵⁹

- El recuento en placa se realizó tomando una alícuota de 10 µl del control de crecimiento (columna 12) inmediatamente después de su inoculación, alícuota que se diluyó en 10 ml de solución salina al 0.45 %, se mezcló perfectamente en vortex.
- Se tomó una alícuota de 100 µl que se distribuyeron en forma radiada en una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de carnero al 5 %.
- La placa fue incubada de 20 a 24 horas a 37°C en presencia de 5 % de CO₂, el crecimiento de 50 UFC/ml, indicó una densidad de inóculo de 5x10⁵ UFC/ml.

3.3.4.3. Control de Crecimiento.

El control de crecimiento o control positivo se utilizó principalmente para evaluar la viabilidad del microorganismo en estudio, así como control de turbidez para determinar los puntos de corte (determinación de CIM's).⁵⁹

- El control de crecimiento se incluyó en cada una de las placas de microdilución utilizadas (columna 12), el cual contenía:
 - a) 50µl de caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 3% de sangre lisada de caballo.
 - b) 50µl de la suspensión bacteriana a evaluar.

3.3.4.4. Control de Esterilidad.

En el caso del método de microdilución el control de esterilidad es sumamente importante, ya que es muy probable que los cultivos mixtos puedan pasar desapercibidos.⁵⁹

- Se realizó incubando un tubo con 10 ml de caldo Mueller-Hinton, suplementado con 3.0% de sangre lisada de caballo de 20 a 24 horas a 35°C, de cada lote empleado.
- Así como una placa de agar Mueller-Hinton, suplementado con sangre de carnero al 5% (utilizadas para el control del inóculo), también fue incubada de 20 a 24 horas a 35°C, en presencia de CO₂ al 5% de cada lote empleado.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS.

La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó a un total de 315 cepas de *Streptococcus pneumoniae*; 130 cepas fueron recuperadas de pacientes que asistieron al INER de enero de 1995 a diciembre de 1999 y 185 cepas de enero 2000 a diciembre 2001. Las cepas fueron obtenidas de muestras de expectoración (47%), lavado bronquioloalveolar (29%), exudado nasal (14%), exudado faríngeo (4%), líquido pleural (4%), sangre (1%) y otras fuentes (1%). El 30% de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* provenían de pacientes con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 22% con neumonía, 4% con tuberculosis pulmonar (TBP), 8% bronquiectasias, 8% infección del tracto respiratorio, 7% asma, 3% cáncer, 1% empiema y 17% otros (figura 1). La resistencia a la penicilina fue superior en pacientes con neumonía (32.2% altamente resistente), que en aquellos pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (23.1%), datos que se observan en la figura 2. El 53.5% de las cepas aisladas del tracto respiratorio inferior (254 cepas) y el 45.5% del tracto respiratorio superior (59 cepas), presentaron algún grado de resistencia a penicilina como se muestra en la tabla 1

Los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* se agruparon de acuerdo a la edad del paciente, el grupo entre 0 a 15 años de edad mostró una proporción del 26.1% de resistencia elevada a penicilina, pacientes entre 16 a 64 años el 23.3% y mayores de 64 años el 20%; simultáneamente estos grupos presentaron el 26.1%, 29.3% y 30% de resistencia elevada a eritromicina respectivamente (tabla 2).

De las 315 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, el 47% (150 cepas) fue sensible, el 29.2% (92 cepas) mostró resistencia intermedia y el 23.2% (73 cepas) resistencia elevada a

penicilina, con valores de CIM's de 0.004 a 128 µg/ml. En comparación con otros β-lactámicos evaluados el antibiótico con mayor actividad fue amoxicilina/ ácido clavulánico con el 99% de sensibilidad y una CIM₉₀ de 1µg/ml. La cefalosporina más activa contra aislamientos de neumococo fue ceftriaxona con el 91.4% de sensibilidad (CIM₉₀ de 0.5µg/ml), mientras que cefaclor con el 34% de resistencia elevada (CIM₉₀ de 64 µg/ml) y cefuroxima con 27.9% (CIM₉₀ de 4µg/ml) fueron las menos activas. Los macrólidos evaluados presentaron una alta proporción de resistencia elevada, siendo el 31.7% para claritromicina y 28.6% para eritromicina, ambos con una potencia semejante de acuerdo al valor de la CIM₉₀ de 32µg/ml. De las fluoroquinolonas, ciprofloxacina presentó la mayor proporción de resistencia elevada (24.1%), a diferencia del 1.3%, 1% y 0.6% de ofloxacina, levofloxacina y gatifloxacina respectivamente, la actividad antimicrobiana conforme al valor de CIM₉₀ fue mayor para gatifloxacina > levofloxacina > ofloxacina = ciprofloxacina. Trimetoprim/sulfametoxazol presentó el 46.7% de resistencia elevada con una CIM₉₀ de 8µg/ml, seguido por el 31.7% de tetraciclina con una CIM₉₀ de 32µg/ml y 11.1% de cloranfenicol con una CIM₉₀ de 8µg/ml (tabla 3).

La prevalencia en la resistencia antimicrobiana (intermedia y elevada) incremento para algunos antibióticos entre el periodo 1995-1999 y 2000-2001, como claritromicina y eritromicina que incrementaron de 24% de resistencia a 40.5% y 33.5% respectivamente, trimetoprim/sulfametoxazol de 52% a 62.7%, amoxicilina/ácido clavulánico de 2.1% a 5.9% y gatifloxacina de 3% a 7.6%; ninguno de los antibióticos mencionados presentó alteración en su potencia de acuerdo al valor de CIM₉₀, tablas 4 y 5. Los agentes antimicrobianos que mostraron un cambio estadísticamente significativo, conforme a la

prueba de χ^2 fueron claritromicina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol (tabla 6 y figura 3).

De las 73 cepas con resistencia elevada a la penicilina, el 95.9% fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico, gatifloxacina y levofloxacina, a pesar de estos resultados el antibiótico con mayor actividad fue gatifloxacina al inhibir el 50% y 90% de los aislamientos con valores de CIM's de 0.03 a 4 μ g/ml (CIM₅₀ de 0.125 μ g/ml, CIM₉₀ de 0.25 μ g/ml y CIM_{medal} de 0.125 μ g/ml). Los agentes menos activos contra este grupo fueron trimetoprim/sulfametoxazol (83.6% de resistencia elevada) con una CIM₉₀ de 16 μ g/ml y CIM_{50/medal} de 8 μ g/ml; cefaclor (90.4%) con valores de CIM_{50/90/medal} de 64 μ g/ml; y cefuroxima (87.7%) con una CIM_{50/medal} de 4 μ g/ml y CIM₉₀ de 8 μ g/ml. Los valores de las CIM's de cada uno de los antibióticos evaluados variaron conforme al fenotipo de susceptibilidad a penicilina (sensible, intermedio o resistente), es decir que los valores de las CIM's son menores cuando se trata de aislamientos sensibles que cuando estos son resistentes a penicilina, como se observa en la tabla 7. En la tabla 8, se muestra una clara relación entre los aislamientos con el fenotipo de resistencia a penicilina y resistencia a antibióticos no β -lactámicos (eritromicina, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina y cloranfenicol), dicha asociación fue mayor al comparar la actividad de trimetoprim/sulfametoxazol con aislamientos resistentes a penicilina en los periodos de 1995-1999 y 2000-2001.

Figura 1. Distribución de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* de acuerdo al origen de aislamiento y a la entidad clínica

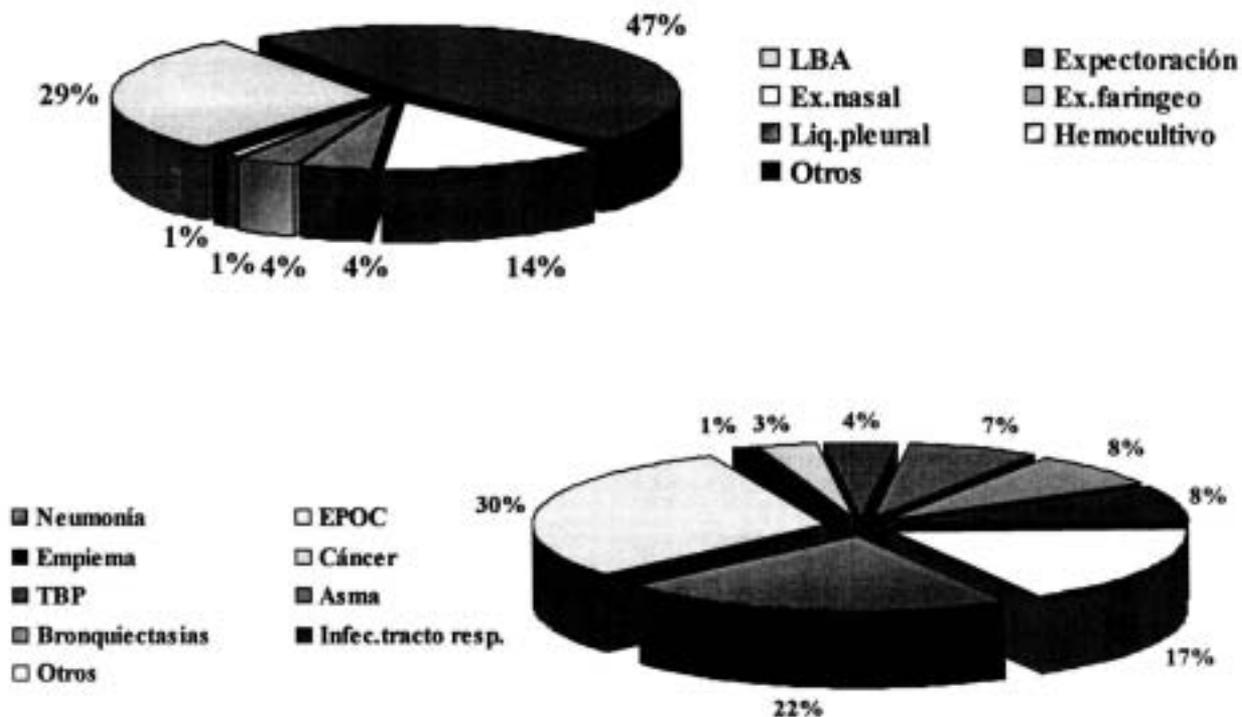


Figura 2. Susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina de acuerdo al diagnóstico.

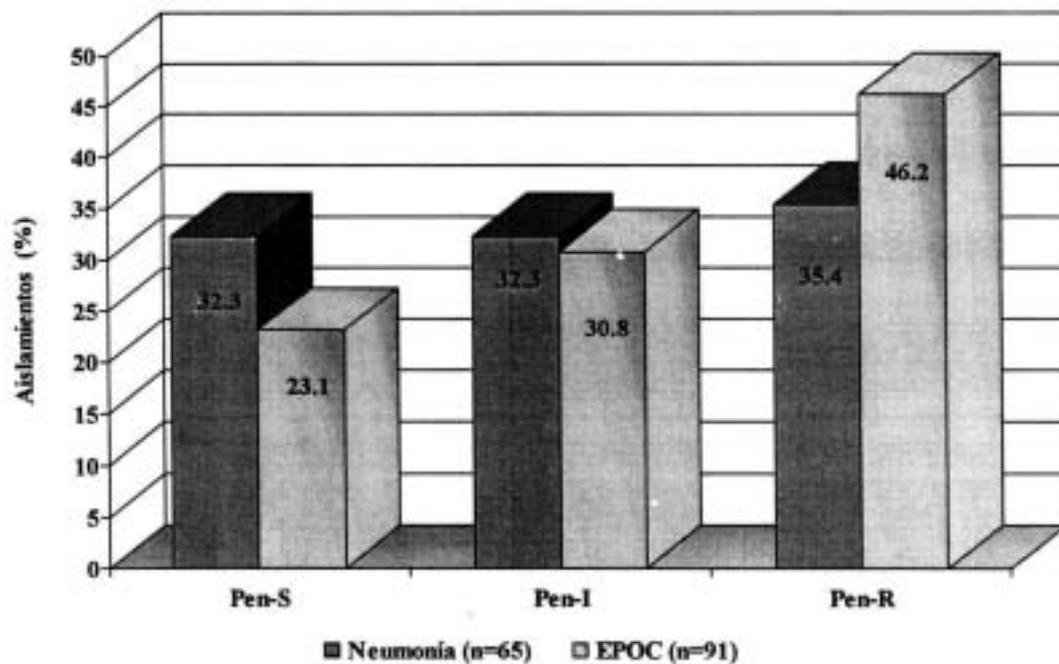


Tabla 1. Distribución de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* de acuerdo al origen de los especimenes

Origen	% Cepas	Susceptibilidad a la penicilina.		
		Sensibles %	Intermedia %	Resistencia %
Tracto respiratorio inferior	80.6	46.5	29.5	24
Tracto respiratorio superior	18.8	54.2	28.8	16.6
Hemocultivo	0.6	NA	NA	NA
Total de cepas (315)	100	47.6	29.2	23.2

NA: no aplicable.

Tabla 1. Distribución de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* de acuerdo al origen de los especimenes

Origen	% Cepas	Susceptibilidad a la penicilina.		
		Sensibles %	Intermedia %	Resistencia %
Tracto respiratorio inferior	80.6	46.5	29.5	24
Tracto respiratorio superior	18.8	54.2	28.8	16.6
Hemocultivo	0.6	NA	NA	NA
Total de cepas (315)	100	47.6	29.2	23.2

NA: no aplicable.

Tabla 3. Actividad *in vitro* de 315 cepas de *Streptococcus pneumoniae* a diferentes antimicrobianos durante 1995 - 2001.

Antibiótico 1995-2001	CIM₅₀ (µg/ml)	CIM₉₀ (µg/ml)	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	Rango de CIM (µg/ml)
Penicilina	0.125	4	150 (47.6)	92 (29.2)	73 (23.2)	0.004-128
Cefaclor	1	64	188 (59.7)	20 (6.3)	107 (34)	0.004-128
Cefuroxima	0.125	4	217 (68.9)	10 (3.2)	88 (27.9)	0.004-16
Ceftriaxona	0.031	0.5	288 (91.4)	23 (7.3)	4 (1.3)	0.004-32
Claritromicina	0.016	32	209 (66.3)	6 (2)	100 (31.7)	0.001-128
Eritromicina	0.016	32	222 (70.5)	3 (1)	90 (28.5)	0.004-128
Levofloxacin	0.5	1	311 (98.7)	1 (0.3)	3 (1)	0.002-16
Ofloxacin	1	2	297 (94.3)	14 (4.4)	4 (1.3)	0.001-32
Ciprofloxacina	0.5	2	239 (75.9)		76 (24.1)	0.001-4
Gatifloxacina	0.125	0.25	310 (98.4)	3 (1)	2 (0.6)	0.0005-4
Cloranfenicol	2	8	280 (88.9)		35 (11.1)	0.062-32
Tetraciclina	0.125	32	210 (66.7)	5 (1.6)	100 (31.7)	0.002-128
Amoxicilina/clav	0.031	1	312 (99.1)	2 (0.6)	1 (0.3)	0.004-8
Trim/sulfa	1	8	133 (42.2)	35 (11.1)	147 (46.7)	0.002-32

Amoxicilina/clav: amoxicilina/ ácido clavulánico; Trim/sulfa: trimetoprim /sulfametoxazol

Tabla 4. Actividad *in vitro* de 130 cepas de *Streptococcus pneumoniae* a diferentes antimicrobianos durante 1995 - 1999.

Antibiótico 1995-1999	CIM₅₀ (µg/ml)	CIM₉₀ (µg/ml)	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	Rango de CIM (µg/ml)
Penicilina	0.125	4	60 (46.2)	34(26.2)	36 (27.6)	0.004-8
Cefaclor	1	64	73 (56.2)	6 (4.6)	51(39.2)	0.004-128
Cefuroxima	0.125	4	89 (68.5)	9 (6.9)	32(24.6)	0.004-18
Ceftriaxona	0.016	1	115 (88.5)	13 (10)	2 (1.5)	0.004-2
Claritromicina	0.008	32	99 (76.2)	1 (0.8)	30 (23)	0.002-128
Eritromicina	0.016	32	99 (76.2)		31(23.8)	0.004-8
Levofloxacin	0.5	1	128 (98.4)	1 (0.8)	1 (0.8)	0.031-16
Ofloxacin	1	2	126 (96.8)	2 (1.6)	2 (1.6)	0.125-16
Ciprofloxacina	1	2	94 (72.3)		36(27.7)	0.002-4
Gatifloxacina	0.125	0.25	128 (98.4)	2 (1.6)		0.0005-2
Cloramfenicol	2	8	109 (83.8)		21 (16.2)	0.125-16
Tetraciclina	0.125	32	85 (65.4)	2 (1.6)	43 (33)	0.004-64
Amoxicilina/clav	0.031	1	127 (97.6)	2 (1.6)	1(0.8)	0.004-8
Trim/sulfa	1	8	63 (48.5)	18 (13.8)	49 (37.7)	0.004-32

Amoxicilina/clav: amoxicilina/ ácido clavulánico; Trim/sulfa: trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabla 5. Actividad *in vitro* de 185 cepas de *Streptococcus pneumoniae* a diferentes antimicrobianos durante 2000 - 2001.

Antibiótico 2000-2001	CIM₅₀ (µg/ml)	CIM₉₀ (µg/ml)	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	Rango de CIM (µg/ml)
Penicilina	0.125	4	90 (48.6)	58 (31.4)	37(20)	0.002-128
Cefaclor	1	64	132 (71.4)	6(3.2)	47 (25.4)	0.008-128
Cefuroxima	0.125	4	132 (71.4)	6(3.2)	47(25.4)	0.002-8
Ceftriaxona	0.062	0.5	173 (93.5)	10 (5.4)	2 (1.1)	0.002-32
Claritromicina	0.031	32	110 (59.5)	5 (2.7)	70 (37.8)	0.001-128
Eritromicina	0.031	32	123 (66.5)	3 (1.6)	59 (31.9)	0.002-128
Levofloxacin	0.5	1	183 (98.9)		2(1.1)	0.002-16
Ofloxacin	1	2	171 (92.4)	12 (6.5)	2 (1.1)	0.250-32
Ciprofloxacina	0.5	2	145 (78.4)		40 (21.6)	0.001-4
Gatifloxacina	0.125	0.25	182 (98.4)	1 (0.5)	2 (1.1)	0.001-4
Cloramfenicol	1	4	171 (92.4)		14(7.6)	0.062-32
Tetraciclina	0.125	32	125 (67.6)	3 (1.6)	57 (30.8)	0.002-128
Amoxicilina/clav	0.031	1	174 (94.1)	11 (5.9)		0.001-2
Trim/sulfa	1	8	69 (37.3)	45 (24.3)	71 (38.4)	0.002-32

Amoxicilina/clav: amoxicilina/ ácido clavulánico Trim/sulfa: trimetoprim/ sulfametoxazol

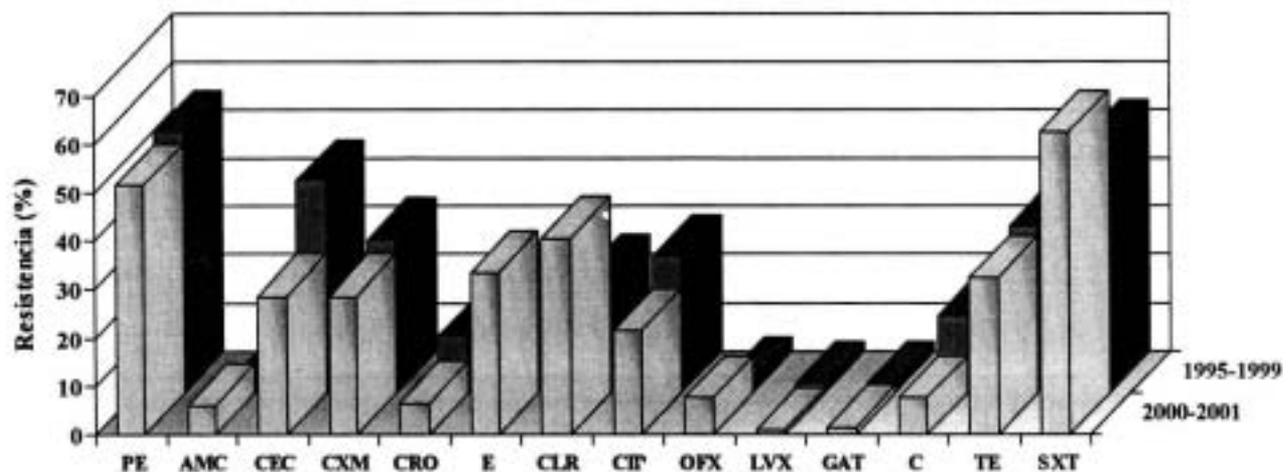
Tabla 6. Prevalencia de la Resistencia y Concentración Inhibitoria Mínima para *Streptococcus pneumoniae* en 1995-1999 (n =130) y 2000-2001 (n = 185).

Antimicrobiano	Año	MIC MODAL	MIC 90	% Resistencia
Penicilina	1995-1999	2	4	54
	2000-2001	0.016	4	51.4
Amoxicilina/clav	1995-1999	1	1	2
	2000-2001	0.008	1	5.9
Cefaclor	1995-1999	0.5	64	44
	2000-2001	0.5	64	28.6
Cefuroxima	1995-1999	4	4	31.5
	2000-2001	0.008	4	28.6
Ceftriaxona	1995-1999	0.004	1	12
	2000-2001	0.008	0.5	6.5
Eritromicina	1995-1999	0.008	32	24
	2000-2001	0.016	32	33.5
Claritromicina	1995-1999	0.002	32	24**
	2000-2001	0.008	32	40.5
Tetraciclina	1995-1999	32	32	34.5
	2000-2001	0.125	32	32.4
Cloranfenicol	1995-1999	2	8	16**
	2000-2001	2	4	7.6
Trim/sulfa	1995-1999	8	8	52**
	2000-2001	8	8	62.7
Ciprofloxacina	1995-1999	1	2	28
	2000-2001	0.5	2	21.6
Ofloxacina	1995-1999	2	2	3
	2000-2001	1	2	7.6
Gatifloxacina	1995-1999	0.125	0.25	2
	2000-2001	0.125	0.25	1.6
Levofloxacina	1995-1999	0.5	1	2
	2000-2001	0.5	1	1.1

*Los aislamientos resistentes incluyen los intermedios y resistentes.

**El cambio fue significativo.

Figura 3. Prevalencia de la resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* durante el periodo de 1995-1999 y 2000-2001.



PE: penicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; CEC: cefaclor; CXM: cefuroxima; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; CLR: claritromicina; CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; LVX: levofloxacina; GAT: gatifloxacina; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabla 7. Actividad *in vitro* de *Streptococcus pneumoniae* de acuerdo a la susceptibilidad a penicilina

Antibiótico 95-01	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	CIM ₅₀ (µg/ml)	CIM ₉₀ (µg/ml)	MODA (µg/ml)	Rango de CIM _(µg/ml)
Penicilina							
total							
PenS	150 (47.6)			0.016	0.062	0.016	0.004-0.062
PenI		92 (29.2)		0.250	1	0.250	0.125-1
PenR			73 (23.2)	4	8	2	2-128
Cefaclor							
total	188 (59.7)	20 (6.3)	107 (34.0)	1	64	0.5	0.004-128
PenS	141 (94)	6 (4.0)	3 (2.0)	0.5	1	0.5	0.004-64
PenI	41 (44.6)	13 (14.1)	38 (41.3)	2	64	1	0.031-64
PenR	6 (8.2)	1 (1.4)	66 (90.4)	64	64	64	0.062-128
Cefuroxima							
total	217 (68.9)	10 (3.2)	88 (27.9)	0.125	4	0.008	0.004-16
PenS	147 (97.7)	1 (0.8)	2 (1.5)	0.008	0.125	0.008	0.004-4
PenI	65 (70.7)	5 (5.4)	22 (23.9)	0.25	2	0.25	0.004-16
PenR	5 (6.8)	4 (5.5)	64 (87.7)	4	8	4	0.004-16
Ceftriaxona							
total	288 (91.4)	23 (7.3)	4 (1.3)	0.031	0.5	0.008	0.004-32
PenS	148 (98.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	0.008	0.062	0.004	0.004-16
PenI	90 (97.8)	1 (1.1)	1 (1.1)	0.062	0.5	0.031	0.004-32
PenR	50 (68.5)	21 (28.8)	2 (2.7)	0.5	1	0.5	0.004-2
Amoxicilina/clav							
total	312 (99)	2 (0.6)	1 (0.3)	0.031	1	0.008	0.004-8
PenS	150 (100)			0.008	0.031	0.008	0.004-1
PenI	92 (100)			0.125	1	0.125	0.008-2
PenR	70 (95.9)	2 (2.7)	1 (1.4)	1	2	1	0.004-8

Tabla 7. Continuación.

Antibiótico 95-01	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	CIM ₅₀ (µg/ml)	CIM ₉₀ (µg/ml)	MODA (µg/ml)	Rango de CIM _(µg/ml)
Claritromicina							
total	209 (66.3)	6 (1.9)	100 (31.7)	0.016	32	0.008	0.001-128
PenS	129 (86.0)	1 (0.7)	20 (13.3)	0.008	2	0.002	0.001-128
PenI	43 (46.7)	2 (2.2)	47 (51.1)	1	64	0.002	0.002-128
PenR	37 (50.7)	3 (4.1)	33 (45.2)	0.125	64	0.002	0.002-128
Eritromicina							
total	222 (70.5)	3 (1.0)	90 (28.6)	0.016	32	0.016	0.004-128
PenS	133 (88.7)		17 (11.3)	0.008	1	0.008	0.004-64
PenI	45 (48.9)	1 (1.1)	46 (50.0)	0.5	64	0.016	0.004-128
PenR	44 (60.3)	2 (2.7)	27 (37.0)	0.062	64	0.016	0.004-128
Cloramfenicol							
total	280 (88.9)		35 (11.1)	2	8	2	0.062-32
PenS	147 (98.0)		3 (2.0)	1	2	2	0.125-16
PenI	85 (92.4)		7 (7.6)	2	4	2	0.062-16
PenR	48 (65.8)		25 (34.2)	2	16	2	0.5-32
Tetraciclina							
total	210 (66.7)	5 (1.6)	100 (31.7)	0.125	32	0.125	0.002-128
PenS	123 (82.0)	1 (0.7)	26 (17.3)	0.062	8	0.031	0.002-128
PenI	52 (56.5)	2 (2.2)	38 (41.3)	0.125	64	0.250	0.002-64
PenR	35 (47.9)	2 (2.7)	36 (49.3)	4	32	32	0.004-64
Trim/sulfa							
total	133 (42.1)	35 (11.1)	147 (46.9)	1	8	8	0.002-32
PenS	97 (64.7)	22 (14.7)	31 (20.6)	0.250	4	0.250	0.004-8
PenI	29 (31.5)	8 (8.7)	55 (59.8)	2	16	8	0.016-32
PenR	7 (9.6)	5 (6.8)	61 (83.6)	8	16	8	0.002-32

Tabla 7. Continuación.

Antibiótico 95-01	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	CIM₅₀ (µg/ml)	CIM₉₀ (µg/ml)	MODA (µg/ml)	Rango de CIM_(µg/ml)
Levofloxacin							
total	311 (98.7)	1 (0.3)	3 (1.0)	0.5	1	0.5	0.002-16
PenS	149 (99.3)	1 (0.7)		0.5	1	0.5	0.002-4
PenI	92 (100)			0.5	1	0.5	0.031-2
PenR	70 (95.9)		3 (4.1)	0.5	2	0.5	0.250-16
Ofloxacin							
total	297 (94.3)	14 (4.4)	4 (1.3)	1	2	1	0.001-32
PenS	143 (95.3)	7 (4.7)		1	2	1	0.250-4
PenI	89 (96.7)	3 (3.3)		1	2	1	0.125-4
PenR	65 (89.0)	4 (5.5)	4 (5.5)	2	4	2	0.5-32
Ciprofloxacina							
total	239 (75.9)		76 (24.1)	0.5	2	0.5	0.001-4
PenS	125 (83.3)		25 (16.7)	0.5	2	1	0.001-2
PenI	70 (76.1)		22 (23.9)	0.5	2	0.5	0.031-4
PenR	44 (60.3)		29 (39.7)	1	2	2	0.125-4
Gatifloxacina							
total	310 (98.4)	3 (1)	2 (0.6)	0.125	0.25	0.125	0.0005-4
PenS	148 (98.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	0.125	0.250	0.125	0.001-4
PenI	92 (100)			0.125	0.250	0.125	0.004-1
PenR	70 (95.9)	2 (2.7)	1 (1.4)	0.125	0.250	0.125	0.031-4

Amoxicilina/clav: amoxicilina/ ácido clavulánico; Trim/sulfa: trimetoprim/ sulfametoxazol.

PenS: penicilina sensible; PenI: penicilina intermedio; PenR: penicilina resistente.

Tabla 8. Asociación entre el fenotipo de susceptibilidad a penicilina de *Streptococcus pneumoniae* y resistencia a no β -lactámicos.

	1995-1999			2000-2001		
	Pen-S (%)	Pen-I (%)	Pen-R (%)	Pen-S (%)	Pen-I (%)	Pen-R (%)
Eritromicina	11.7	41.2	27.8	11	55.2	45.9
Tetraciclina	20	47	41.7	15.6	37.9	56.8
Cloranfenicol	0	14.7	44.4	3.3	3.4	24.3
Trim/ sulfa	8.3	38.2	86.1	15.6	53.4	70.3
Cepas evaluadas	60	34	36	90	58	37

Pen-S: penicilina sensible; Pen-I: penicilina intermedio; Pen-R: penicilina resistente; Trim/ sulfa: trimetoprim/ sulfametoxazol.

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN.

Actualmente la resistencia antimicrobiana del *Streptococcus pneumoniae* es de gran importancia en el ámbito mundial por su rápida difusión, así como por el espectro cada vez mayor de antibióticos que se incluyen en la multirresistencia, convirtiendo la elección del tratamiento antimicrobiano en un desafío ante pacientes con infecciones graves.

La incidencia en la resistencia a la penicilina en este estudio fue del 52.4%, similar a lo reportado en España, Hungría, en algunas ciudades de África y Estados Unidos; pero superior a lo reportado en Canadá y algunos países de Sudamérica como Uruguay, Argentina, Brasil y Colombia.⁷⁸

En México la información que se tiene sobre la prevalencia de la resistencia a penicilina del *Streptococcus pneumoniae* es escasa y la existente se ha enfocado principalmente a la población pediátrica, dificultando el análisis interhospitalario a nivel local y nacional. No obstante se puede percibir un incremento considerable a partir de los resultados publicados en 1981 por Guiscafré³⁴ (7.5% de aislamientos resistentes) a lo reportado por Calderón Jaimes⁵⁰ en 1999 (28.9% de resistencia), y Gómez Barreto³⁰ en el 2000 (51% de resistencia), hasta lo observado en este estudio durante el periodo de 1995-2001 en donde se halló un 52.4% de resistencia a penicilina.³¹

De las cefalosporinas evaluadas, la menor actividad antimicrobiana fue mostrada por cefaclor y cefuroxima con el 59.7% y 68.9% de sensibilidad respectivamente; la mayor actividad antineumocócica se registró con ceftriaxona al inhibir el 90% de los aislamientos con una concentración de 0.5 µg/ml. Asimismo la actividad de las cefalosporinas disminuye cuando estas son evaluadas contra aislamientos resistentes a penicilina, ya que

ambos comparten el mecanismo de resistencia, debido únicamente a alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBP's), ocasionando una disminución o pérdida de sensibilidad a otros antibióticos β -lactámicos.³⁰

Los macrólidos han sido durante mucho tiempo una alternativa en el tratamiento contra neumococos resistentes a penicilina, en la actualidad ambos antibióticos presentan resistencia cruzada, a pesar de diferir en su mecanismo de resistencia. En este estudio se evaluó la actividad de eritromicina y claritromicina, encontrando una alta proporción de resistencia para ambos macrólidos (29.6% para eritromicina y 33.6% para claritromicina, similar a lo publicado por Gómez Barreto⁶⁶ en el 2000), ya que el 90% de los aislamientos se inhibe con una concentración de 32 μ g/ml, siendo que el punto de corte para considerarse como sensible es de 0.25 μ g/ml.

La tetraciclina mostró un ligero incremento de resistencia antimicrobiana en comparación al 28.9% de resistencia reportado en 1993 por Calderón Jaimes⁵⁵ y el 33.3% encontrado en este estudio, en donde el 90% de las cepas es inhibido por una concentración de 32 μ g/ml.

La frecuencia en la resistencia a cloranfenicol en nuestro país es variable, pues se ha reportado desde un 4% hasta un 38.5% en los últimos años.^{30, 31, 37, 41, 55, 66} En este instituto se halló una incidencia del 11.1% de resistencia, sin embargo al comparar datos obtenidos durante el periodo de 1995-1999, podemos observar una disminución estadísticamente significativo de 16% de resistencia (CIM₉₀ de 8 μ g/ml) a un 7.6% (CIM₉₀ de 4 μ g/ml) en el periodo 2000-2001, ya que actualmente es poco empleado en la práctica clínica.

La mayor proporción de resistencia detectada después de la penicilina, correspondió a trimetoprim/sulfametoxazol con el 46.9%, resultado que concuerda con lo notificado en otras partes del mundo y lo reportado por varios autores en nuestro país.^{12, 13, 30, 31, 55, 77}

Aunque las fluoroquinolonas presentaron buena actividad antineumocócica, incluso contra neumococos resistentes a penicilina, excepto ciprofloxacina; son antibióticos poco recomendados como tratamiento de primera elección por sus efectos tóxicos y por su amplio espectro que puede ocasionar un rápido surgimiento de resistencia.³²

De los antibióticos evaluados amoxicilina/ ácido clavulánico, continua siendo el antibiótico con mayor actividad antimicrobiana con un 99.1% de sensibilidad.

La edad de los pacientes no fue un factor predictivo para la infección por neumococo o de asociación con la resistencia a penicilina; ya que la mayor proporción de aislamientos se detectó en pacientes entre 16 a 64 años de edad, siendo que a los pacientes pediátricos y geriátricos se les prescribe una mayor cantidad de antibióticos β -lactámicos, además de ser más susceptibles de infección por neumococo.

La neumonía es la forma clínica más frecuente de enfermedad invasiva causada por neumococos resistentes a penicilina (64.6% de resistencia), lo cual nos indica que la penicilina no es una buena alternativa para el tratamiento de la neumonía, sin embargo, se ha publicado que pacientes con neumonía que no requieren de hospitalización pueden ser tratados con penicilina o algún otro β -lactámico oral (ceftriaxona o la combinación de amoxicilina con ácido clavulánico), asimismo pacientes con neumonía grave o crónica que requieren de hospitalización se recomienda utilizar un β -lactámico por vía parenteral o intravenosa, incluso penicilina a dosis elevadas. En caso de alergia a los β -lactámicos, los macrólidos pueden ser una buena alternativa.³³

A pesar de que el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, atiende a pacientes de distintas áreas del Distrito Federal y sus alrededores, los resultados obtenidos en este

estudio no pueden ser extrapolables a otros centros hospitalarios ya que la susceptibilidad antimicrobiana debe ser considerada bajo ciertas condiciones de tipo geográfico, administración previa de antibióticos, presencia de algún padecimiento de base, estancia hospitalaria, grupo etéreo etc. Sin embargo, los resultados obtenidos nos proporcionan un panorama de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana del *Streptococcus pneumoniae*, indicándonos la importancia de mantener un programa de vigilancia de sensibilidad a los antibióticos más utilizados.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES.

- ♦ La incidencia en la resistencia a penicilina del *Streptococcus pneumoniae* en el INER fue del 52.4%, durante el periodo de 1995-2000.
- ♦ La prevalencia en la resistencia a penicilina no mostró cambio significativo entre los periodos 1995-1999 y 2000-2001 analizados en el INER.
- ♦ Amoxicilina/ ácido clavulánico continua siendo el antibiótico con mayor actividad antineumocócica, con el 99% de aislamientos sensibles.
- ♦ El antibiótico con menor actividad fue trimetoprim/sulfametoxazol con el 57.8% de resistencia, siendo una mala alternativa para el tratamiento de infecciones respiratorias por *Streptococcus pneumoniae*.
- ♦ La fluoroquinolona con menor actividad es ciprofloxacina, confirmando que no es una buena alternativa para el tratamiento de infecciones respiratorias por *Streptococcus pneumoniae*.
- ♦ Amoxicilina/ ácido clavulánico, gatifloxacina y levofloxacina, fueron los antibióticos con la mejor actividad contra aislamientos resistentes a penicilina de *Streptococcus pneumoniae*.
- ♦ La neumonía es la entidad clínica más frecuente de enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae*.

APÉNDICE

7.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE.

Las soluciones madre o stock se prepararon a partir de la sal pura del antibiótico, tomando en cuenta su potencia, la concentración a evaluar (dos concentraciones arriba de la concentración deseada) y el volumen que se desea preparar (tabla 1). La siguiente fórmula puede ser utilizada para determinar la cantidad de antibiótico necesario para una solución estandarizada:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen(ml)} \times \text{Concentración}(\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia}(\mu\text{g/mg})}$$

Algunos antibióticos deben de ser disueltos en solventes diferentes del agua. En tales casos:

- Se debe de utilizar una cantidad mínima del solvente para solubilizar el antibiótico puro.
- La concentración final de la solución madre pueda ser diluida en agua o en el buffer adecuado como se indica en la Tabla 2.

Debido a que la contaminación microbiana es extremadamente rara, las soluciones que no han sido esterilizadas son en general aceptables. Sin embargo, las soluciones pueden ser esterilizadas a través de un filtro de membrana si así se desea. No se debe de utilizar papel, asbesto o filtros de vidrio, los cuales podrían absorber cantidades apreciables de antibiótico.

Las soluciones madre pueden ser envasadas en volúmenes pequeños en tubos de vidrio estériles, o frascos de polietileno y almacenadas a una temperatura menor o igual de -20°C por 6 meses o más sin pérdida significativa de la actividad. El antibiótico puede ser descongelado y utilizado el mismo día, desechando la solución que no fue utilizada.³⁹

Tabla 1. Esquema para preparar las Soluciones Stock de los agentes antimicrobianos para utilizar en pruebas de susceptibilidad por dilución en caldo.⁵⁹

Antibiótico	Concentración (µg/ml)	Potencia (µg/mg)	Volumen (ml)	Peso (mg)
Penicilina	256	1637.63	100	15.632
Amoxicilina	128	870.9	100	14.697
Ac. clavulánico	64	953.0	100	6.715
Cefaclor	256	956.6	100	260761
Cefuroxima	256	1013.0	100	25.271
Ceftriaxona	256	1000.1	100	25.597
Eritromicina	128	629.0	100	20.349
Claritromicina	128	995.0	100	12.864
Levofloxacin	128	1002.0	100	12.774
Ofloxacin	128	986.5	100	12.975
Gatifloxacin	32	936.0	100	3.419
Ciprofloxacina	8	990.0	100	0.808
Tetraciclina	256	1021.0	100	25.073
Cloranfenicol	64	999.0	100	6.406
Sulfametoxazol	2432	996.0	100	244.176
Trimetoprim	128	996.0	100	12.851

Tabla 2. Solventes y Diluyentes para la Preparación de Soluciones Stock de los Agentes Antimicrobianos Utilizados.⁵⁹

Antibiótico	Solvente	Diluyente
Penicilina	Agua ¹	Agua ¹
Amoxicilina	Buffer Fosfatos pH:6.0	Buffer Fosfatos pH:6.0
Ac. Clavulánico	Buffer Fosfatos pH:6.0	Buffer Fosfatos pH:6.0
Cefaclor	Agua ¹	Agua ¹
Cefuroxima	Agua ¹	Agua ¹
Ceftriaxona	Agua ¹	Agua ¹
Eritromicina	95% Etanol	Agua ¹
Claritromicina	Metanol	Buffer Fosfatos pH = 6.5
Levofloxacin	½ volumen de agua, NaOH 0.1 M	Agua ¹
Ofloxacin	½ volumen de agua, NaOH 0.1 M	Agua ¹
Gatifloxacin	½ volumen de agua, NaOH 0.1 M	Agua ¹
Ciprofloxacina	Agua ¹	Agua ¹
Tetraciclina	Agua ¹	Agua ¹
Cloranfenicol	95% Etanol	Agua ¹
Sulfametoxazol	½ volumen de agua caliente y NaOH 2.5 M ²	Agua ¹
Trimetoprim	Agua [*]	Agua ¹

¹ Agua desionizada; ² El NaOH se adiciona gota a gota; ^{*} Agregar unas gotas de HCl.

7.2. PUNTOS DE CORTE PARA *Streptococcus pneumoniae*.

Tabla 7.2.1. Patrones de Interpretación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para *Streptococcus pneumoniae*⁶⁰

Antibiótico	MIC (µg/ml)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Penicilina	≤ 0.06	0.12 - 1	≥ 2
Amoxicilina/ ácido clavulánico	≤ 2/1	4/2	≥ 8/4
Cefaclor	≤ 1	2	≥ 4
Cefuroxima	≤ 0.5	1	≥ 2
Ceftriaxona	≤ 0.5	1	≥ 2
Eritromicina	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Claritromicina	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Levofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Ofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacina	≤ 1		≥
Gatifloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Tetraciclina	≤ 2	4	≥ 8
Cloranfenicol	≤ 4		≥ 8
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	≤ 0.5/9.5	1/19 – 2/38	≥ 4/76

Tabla 7.2.2. Rangos de Control de Calidad Aceptables de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) para cepas de referencia.⁶⁰

Antibiótico	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
Amoxicilina/ ácido clavulánico.	0.03/0.016 – 0.12/0.06	4/2 – 16/8
Cefaclor	1 – 4	
Ceftriaxona	0.03 – 0.12	
Cefuroxima	0.25 – 1	
Cloranfenicol	2 – 8	
Claritromicina	0.03 – 0.12	
Eritromicina	0.03 – 0.12	
Gatifloxacina	0.12 – 0.5	
Levofloxacina	0.5 – 2	
Ofloxacina	1 – 4	
Penicilina	0.25 – 1	
Tetraciclina	0.12 – 0.5	
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	0.12/2.4 – 1/19	

7.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

1) Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 3% sangre lisada de caballo, pH= 7.2 - 7.4 a 25° C.

I. Componentes:

- Caldo Mueller-Hinton (BBL).
- Sangre lisada de caballo.
- Solución stock de Calcio (20 mg de Ca^{2+} mg/l).
- Solución stock de Magnesio (10 mg de Mg^{2+} mg/l).

II. Preparación:

- a) Pesar y disolver 21g de caldo Mueller-Hinton (deshidratado), en 1L de agua desionizada, calentar hasta completa disolución.
- b) Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C, enfriar a temperatura ambiente.
- c) Adicionar 2 ml de solución stock de Ca^{2+} , 1 ml de solución stock de Mg^{2+} y 30 ml de sangre lisada de caballo.
- d) Envasar en tubos de vidrio estériles a un volumen de 10 ml y almacenar a 4°C.

7.4. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

a) Solución salina al 0.45%.

Disolver 0.45g NaCl (MERCK) en 100 ml agua desionizada. Alicuotar en tubos (10ml), esterilizar en autoclave y almacenar en refrigeración a 4°C.

b) Solución stock de Magnesio (10 mg Mg^{2+} /l).

Pesar 8.36g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (MERCK) y disolver en 100 ml de agua desionizada; esterilizar a través de un filtro de 0.22 μm y almacenar a 4°C.

c) Solución stock de Calcio (10 mg Ca^{2+} /l).

Pesar 3.86g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (MERCK) y disolver en 100 ml de agua desionizada; esterilizar a través de un filtro de 0.22 μm y almacenar a 4°C.

d) Buffer de Fosfatos, pH 6.0

Pesar 1.225g de $Na_2 HPO_4$ (MERCK) y 0.1867g de KH_2PO_4 (MERCK); disolver y aforar a 100ml con agua desionizada, esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

e) Buffer de Fosfatos, pH 6.5.

Pesar 0.7080g de $Na_2 HPO_4$ (MERCK) y 0.6821g de KH_2PO_4 (MERCK), disolver y aforar a 100ml con agua desionizada, esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

BIBLIOGRAFÍA

BIBIOGRAFÍA.

1. Appellbaum P. C. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An Overview. Clin. Infect Dis. 1992; 15:77-83.
2. Appellbaum P. C. Global Status of Pneumococcal Drug Resistance. Department of Clinical Microbiology Hershey Medical Center, PA, USA.
3. Bakir J., De Gentile Á. S. Perfil epidemiológico de las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*. Arch. Argent. Pediatr. 2001; 99: 111-118.
4. Balowns A. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Fifth Edition. 1991.
5. Baquero F. Antimicrobial Resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Patients with Respiratory Tract Infections in Spain: Results of a 1-Year (1996-1997) Multicenter Surveillance Study. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 357 - 359.
6. Baquero F., Loza E. Antibiotic resistance of microorganisms involved in ear, nose and throat infections. Pediatric Infect Dis J. 1994; 13:S9-S14.
7. Benbachir M., Benredjeb S. Two-Year Surveillance of Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Four African Cities. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 627 - 629.
8. Breiman R. F., Butler J. C., Tenover F. Emergence of Drug Resistant Pneumococcal Infections in the United States. JAMA. 1999; 271: 1831-1835.
9. Briles D. E., Creech T. R. Pneumococcal Diversity: Considerations for New Vaccine Strategies with Emphasis on Pneumococcal Surface Protein A (Psp A). Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11:645-657

10. Brueggemann A., Pfaller M. A., Use of Penicillin MICs to Predict In Vitro Activity of Other β -Lactam Antimicrobial Agents against *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:367-369.
11. Butler J. C., Cetron M. S. Pneumococ Drug Resistance: The New "Special Enemy of Old Age". Clin. Infect. Dis. 1999;28:730-735.
12. Calderón J. E. La resistencia antimicrobiana del *Streptococcus pneumoniae* como un problema de salud pública. Salud Pública de Mex. 1999; 41:360-361.
13. Calderón J. E., Echaniz A. G. Resistencia y serotipificación de 83 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños portadores asintomáticos y enfermos. Bol Med Hosp Infant Mex. 1993; 50:854-860.
14. Calva M. J. El neumococo resistente a beta – lactámicos: ¿Cuál es la magnitud real del problema?. Enf Infec y Micro. 2000; 20:167 – 171.
15. Conly J. Antimicrobial resistance in Canada. CMAJ. 2002; 167: 885-891.
16. Coria L. J., Gómez B. D. Actualidades en el tratamiento de la meningitis bacteriana aguda. Bol Med Hosp Infant Mex. 2000; 57:292-303.
17. Charpentier E., Tuomanen E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. Microbes and infection. 2000; 2:1855-1864.
18. Chirinos P. J. Los mecanismos de la Resistencia Microbiana. <http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>
19. De Velasco E. A, Verheul A. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. Microbiol. Rev. 1995; 59: 591-603.
20. Del Castillo M. F. Neumococo resistente a la penicilina. Un grave problema de Salud Pública. An Esp Pediatric. 1996; 45: 233-235.

21. Departamento de Biología Molecular. Mecanismos Moleculares de la Resistencia Bacteriana. 1994; 36: 1-14.
22. Di Fabio J. L., Castañeda E., Agudelo C. I., De la Hoz F. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva – Vigía Group, 1993 to 1999. *Pediatric Infect. Dis.* 2001; 20: 959–967.
23. Doern G. V., Brueggemann A. B. Antimicrobial Resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1997-1998. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5: 757-765.
24. Doern G. V. Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *S. pneumoniae* in the United States during 1999–2000, Including a Comparison of Resistance Rates since 1994–1995. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:1721–1729.
25. Echánis A. G., Solórzano S. F. Enfrentando el reto: prevención de enfermedad neumocócica con vacunas conjugadas. *Salud Pública de Mex.* 2001; 43:1-18.
26. Eliner P. D., Harol C. The Inhibitor Quotient. A Method for Interpreting Minimum Inhibitory Concentration Concentration Data. *JAMA.* 1981; 246:1575-1578.
27. García L. M., Cercenado E. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to Penicillin: A Prospective Microbiological and Clinical Study. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14: 427-435.
28. Gardam M.A. Optochin Revisited: Defining optimal Type of Blood Agar for Presumptive Identification of *S.pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36 (3); 833–834.
29. Gillespe S.H. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. *J. Med. Microbiol.* 1989; 28: 237–248.
30. Gómez B. D., Calderón J. E. Características clinico-microbiológicas de la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina. *Salud Pública de Mex.* 1999; 41: 397–404.

31. Gómez B., Carderón J. E., Clinical Outcome of Invasive Infections in Children Caused by Highly Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Compared With Infections Caused by Penicillin-Susceptible Strains. *Arch. Med. Res.* 2000; 31: 592-598.
32. Gómez B. D., Rodríguez R. S. Bases fisiopatológicas para la prevención de las infecciones por *S. pneumoniae*. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 2001; 58: 866-878.
33. Gray B. M., Converse G. M. Epidemiologic Studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Acquisition, Carriage, and Infection During the First 24 Months of Life. *J. Infect. Dis.* 1980; 142: 923-933.
34. Guiscafre G. H., García M. M., Frecuencia de *Haemophilus influenzae* resistentes a ampicilina y *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina en portadores sanos. *Arch. Invest. Med. Mex.* 1981; 12: 141-151.
35. Heffelfinger J. D., Dowell S. Management of Community-Acquired Pneumonia in the Era of Pneumococcal Resistance. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 1399-1408.
36. Hoban D. J., Doern G.V. Fluit A.C. Worldwide Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (suppl. 2): S81- S93.
37. Hortal M., Ruvinsky R. Impacto de *S. pneumoniae* en las neumonías del niño latinoamericano. Grupo SIREVA-Vigia. *Rev. Panam Salud Publica.* 2000; 8: 185-194.
38. Jacobs M. R. Assessing the Quality of the Alexander Project. *J. Chemotherapy.* 1999; 11:26-34.
39. Jacobs M. R. Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Rational Antibiotic Choices. *Am. J. Med.* 1999; 106: 19s-25s.

40. Jacobs M. R. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: rational antibiotic choices. Am J Med. 1999; 106 (5A): 19S-25S.
41. Jacobs M. R., Appellbaum P. C. Susceptibilidad de 1,100 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas en 1997 de siete países de América Latina y el Caribe. Enf Infec y Micro. 2000; 25: 198- 205.
42. Jacobs M. R. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 Oral Antimicrobial Agents Based on Pharmacodynamic Parameters: 1997 U.S. Surveillance Study. Antimicrob. Agents. Chemother. 1999; 43: 1901-1908.
43. Jedrzejewski M. J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001; 65:187-207.
44. Jorgensen J., Swenson J. Development of Interpretive Criteria and Quality Control Limits for Broth Microdilution and Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2448-2459.
45. Kaplan S. L., Mason E. Management of infections Due to Antibiotic- Resistant *S. pneumoniae*. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11:628-644.
46. Kellongg J. A., Bankert D. A. Identification of *Streptococcus pneumoniae* Revisited. J. Clin. Microbiol. 2001, 39 (9); 3373-3375.
47. Kertesz D. A. Di Fabio J. L., and et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* Infection in Latin American Children: Results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. Clin. Infect. Dis. 1998; 26: 1355-1361.
48. Koneman, A. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana. 1997, 3^{ra} edición.
49. Koornhof H. J., Wasas A. and Klugman K. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: A South African Perspective. Clin. Infect. Dis. 1992; 15; 84 - 94.

50. Leal A. L., Castañeda E. Susceptibilidad a antimicrobianos en aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* invasor en Colombia. Rev. Panam. Salud Publica/ Pan. Am. J. Public Health. 1999; 5(3): 157-163.
51. Leclercq R., Courvalin P. Resistanse to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46; 2727-2734.
52. Llor V. C. Toxicidad de las nuevas quinolonas. MEDIFAM. 2000; 10:303-309.
53. Mac Faddin. Pruebas Bioquimicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Medica Panamericana.
54. Marshall K., Musher D. Testing of *Streptococcus pneumoniae* for Resistance to Penicillin. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1246-1250.
55. Miranda N. M. G., Fortino S. S., Guiscafré G. H. *Streptococcus pneumoniae*: Low Frequency of Penicillin Resistanse and High Resistanse to Trimetoprim-Sulfametoxazole in Nasopharyngeal Isolates from Children in a Rural Area in Mexico. Arch. Med. Res. 1997; 28:559-563.
56. Mitcell T. J. Virulence Factors and the Pathogenesis of Disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. Res. Microbial. 2000. 15; 413-419.
57. Murray. Murray of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D. C., six edition, 1995.
58. Musher D. M. *Streptococcus pneumoniae*. Infection Diseases and Their Etiologic Agents. Part III, 1811-1826.
59. Nactional committee for Clinical Laboratory Standards.2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically. Approved standard. NCCLS document M7, vol. 20, no. 2. Wayne PA, USA.

60. National committee for Clinical Laboratory Standards 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement. M100-S11. Wayne PA, USA.
61. Navarre and Schneewind. Surface Proteins of Gram Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999; 63: 201 – 202.
62. Obaro S. K., Montiel M. A., Henderson D. C. The Pneumococcal Problem. *BMJ.* 1996; 312: 1521 – 1525.
63. Perozo M. A., Castellano G. M. *Streptococcus pneumoniae*: Estado de portador en niños preescolares y susceptibilidad a los antimicrobianos. 1-10.
64. Pneumococcal Disease. [http:// www.cdc.gov/nip/publications/pink/pneumo](http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/pneumo).
65. Po R. H., Yung C. L., Jainn M. S. Multicenter Surveillance of Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998 – 1999 Respiratory Season. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 1342–1345.
66. Ríos A. M., De la Hoz F. Impacto de la resistencia a antimicrobianos y de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en la mortalidad de niños menores de 5 años con enfermedad invasora. *Rev. Panam Salud Publica.* 1999; 5:69-76.
67. Ruvinsky R. *Streptococcus pneumoniae*: un antiguo patógeno generando la emergencia de nuevos problemas epidemiológicos en el campo pediátrico. *Arch. Argent. Pediatr.* 2001; 99 (2); 101 - 104.
68. Sahm D. F., Karlowsky J. A., Kelly L. J. Need for Annual Surveillance of Antimicrobial in *Streptococcus pneumoniae* in the United States; 2-Year Longitudinal Analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 1037–1042.

69. Schrag J. S., Beall B. Limiting the Spread of Resistant Pneumococci: Biological and Epidemiologic Evidence for the Effectiveness of Alternative Interventions. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13: 588-601.
70. Solórzano S. F., Miranda N. M. G. Resistencia de Bacterias Respiratorias. *Salud Pública de Méx.* 1998; 40: 510-516.
71. *Streptococcus pneumoniae* infections: Microbiology, Epidemiology, Treatment and Prevention. http://www.medscape.com/viewarticle/451448_2.
72. *Streptococcus pneumoniae*. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturespneumo>.
73. Sussmann P. O. A., Mattos L., Restrepo A. Resistencia Bacteriana. <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/Vol01-02/Resistencia>.
74. Tapia M. L., Aguilar I. F. Sepsis neonatal por *Streptococcus pneumoniae* serotipo I. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex* 200;57:212-216.
75. Tuomanen E. Molecular and Cellular Biology of Pneumoccal Infection. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2: 35-39.
76. Varon E., Gutmann L. Mechanisms and Spread of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol.* 2000; 151: 471-473.
77. Vásquez De K. Susceptibilidad de Aislamientos Clínicos de *Streptococcus pneumoniae* en un Hospital Pediátrico. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 1995; 52: 336-341.
78. Velázquez M. M., Echaniz A. G. *Streptococcus pneumoniae*: Patogenicidad, virulencia, resistencia antimicrobiana y vacunas. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 1994; 7:149-156.
79. Yamamoto M., Briles D. E., Yamamoto S. A Nontoxic Adjuvant for Mucosal Immunity to Pneumococcal Surface Protein A. *J. Immunology.* 1998. 161: 4115-4121.
80. Zinsser. *Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. 1995, 20ª edición.