

Perfil serológico y antibiotipia de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de portadores nasales pediátricos.

Beatriz Quintero¹ y María Araque².

¹Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas, Facultad de Medicina y

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

Correo electrónico: beatrizquinbratta@hotmail.com

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, serotipos, resistencia antimicrobiana, portadores nasales, niños.

Resumen. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil serológico y la antibiotipia de *S. pneumoniae* aislados de portadores nasales pediátricos. Ciento veinticinco muestras de secreción nasal provenientes de niños fueron cultivadas y estudiadas para detectar la presencia de *Streptococcus pneumoniae*. Las cepas fueron identificadas según métodos microbiológicos estandarizados, la serotipificación por la reacción de Quellung y los patrones de resistencia por el método de microdilución de acuerdo al National Committee for Clinical Laboratory Standards. Los resultados indicaron que la frecuencia de aislamiento de neumococos en la región nasal fue de 24% (n= 30), y los serotipos más comúnmente identificados fueron el 23F (20%), el 6B (20%) y el 14 (13%). El 73% de los aislados fueron resistentes por lo menos a uno de los antibióticos probados. El 47% de las cepas mostraron resistencia a la penicilina y los serotipos más frecuentemente asociados a este marcador fueron el 6B y el 23F. El 60% de las cepas mostró resistencia a la doxiciclina, el 37% al trimetoprim/sulfametoxazol y a la clindamicina, el 30% a eritromicina, el 23% al cloramfenicol, el 7% a ceftriaxona y el 3% a cefepima. Todas las cepas fueron sensibles a la ofloxacina, rifampicina y vancomicina. Los patrones de multirresistencia más comunes fueron PNC-ERI-TMP/SMX-DOX-CLO-CLI (16,59%) y PNC-DOX (13,27%). Los resultados obtenidos en este estudio permitirán orientar la terapia empírica para las infecciones neumocócicas y el uso racional de los antibióticos en la práctica clínica, así como la aplicación de un programa de vacunación adaptado a los serotipos más frecuentemente encontrados en la población infantil.

Serotype profile and antibiotyping of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from nasal carriage in pediatric patients.

Invest Clin 2006; 47(1): 17 - 26

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotype, antibiotics resistance, nasal, carriage, children.

Abstract. The aim of this study was to determine the serotype profile and antibiotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasal isolates in children. Nasopharyngeal swab samples obtained from 125 children were cultivated and screened for the presence of *S. pneumoniae*. Strains were identified according to standard microbiological methods. The isolates were serotyped by the Quellung reaction and resistance patterns were determined by the microdilution method according to NCCLS guidelines. Results indicate an overall pneumococcal carriage rate of 24% (n= 30). The most commonly isolated serotypes were 23F (20%), 6B (20%) and 14 (13%). 73% of isolates were resistant at least to one of the tested antibiotics. 47% of the strains were consistently resistant to penicillin and the serotypes 6B and 23F were frequently associated with this marker. 60% of the strains were resistant to doxycycline, 37% to trimethoprim/sulfamethoxazole and clindamycin, 30% to erythromycin, 23% to cloramphenicol, 7% to ceftriaxone and 3% to cefepime. All strains were sensible to ofloxacin, rifampin and vancomycin. The most common combined resistance patterns were PNC-ERI-TMP/SMX-DOX-CLO-CLI (16.59%) and PNC-DOX (13.27%). The results obtained in this study will allow to orient the empiric therapy for pneumococcal infections and a rational use of antibiotics in clinical practice, as well as the application of an appropriate vaccination program specially adapted to the serotypes more frequently found in children.

Recibido: 02-03-2005. Aceptado: 20-10-2005.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias representan una de las principales causas de morbi-mortalidad a nivel mundial, especialmente durante la primera infancia. En el mundo se registran 94 millones de casos de infecciones respiratorias agudas y mueren 3,9 millones de personas al año por esta causa. *S. pneumoniae* es considerado como el más importante patógeno bacteriano productor de infección respiratoria aguda en la población infantil menor de 2 años (1, 2). La alta incidencia de las infecciones neumocócicas

ha estado directamente relacionada con el incremento de la resistencia en cepas de *S. pneumoniae* a la penicilina y a otras drogas. Es por ello que los estudios en portadores nasales de *S. pneumoniae*, adquieren importancia debido a que pueden determinar la prevalencia de cepas resistentes, sus patrones de resistencia en áreas específicas y, además, contribuyen con la planificación de futuros esquemas de tratamiento para el control y la prevención de las infecciones producidas por este agente (3).

Considerando que la colonización nasofaríngea es el paso previo al desarrollo de

la enfermedad neumocócica, el prevenir la colonización puede ser una vía para disminuir la frecuencia de esta patología (1,4). Por consiguiente, el conocimiento previo de los patrones de susceptibilidad antibiótica y de los tipos serológicos de *S. pneumoniae* que circulan en un área determinada, permitirá la implementación apropiada de futuros esquemas de tratamiento y el desarrollo y aplicación de las vacunas proteína-polisacárido conjugadas. Basados en esta afirmación, en el presente estudio analizamos el perfil serológico y los patrones de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *S. pneumoniae* aisladas de portadores nasales pediátricos provenientes de una comunidad urbana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó microbiológicamente la secreción nasal de un total de 125 niños varones y hembras, con edades comprendidas entre 28 días y 5 años, que acudieron a la emergencia pediátrica del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, Venezuela, durante los meses de febrero a julio de 2000. Se consideraron como criterios de inclusión para el estudio, además de la edad anteriormente señalada, el que el familiar o acompañante accediera a que su representado participara en el estudio y que el paciente seleccionado permitiera la toma de la muestra nasal sin dificultades. Se excluyeron del estudio todos los niños que no cumplieran con los criterios anteriormente señalados o presentarían un trauma facial, una alteración anatómica nasal que impidiera la recolección de la muestra, o el haber estado bajo tratamiento con antibióticos en los últimos 5 días. A cada paciente seleccionado se le elaboró una ficha para la recopilación de la información epidemiológica y clínica.

En cada fosa nasal se introdujo un hisopo de algodón estéril previamente hume-

decido en solución fisiológica también estéril y, mediante la extracción del mismo con movimientos rotatorios, se recolectó una cantidad suficiente de secreción nasal. Esta muestra fue colocada en el medio de transporte de Stuart (Oxoid) y enviada al laboratorio para su procesamiento en un lapso no mayor de 2 horas.

De cada una de las muestras se realizaron dos frotis: uno teñido con Gram para valorar la flora microbiana, y el otro teñido con la coloración de Hansel, para corroborar la presencia de células inflamatorias, así como para la detección de eosinófilos en el moco nasal.

Las muestras fueron inicialmente inoculadas en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Oxoid) suplementado con 5% de sangre humana e incubadas en microaerofilia por 24 o 48 horas a 35°C. La presencia de colonias α -hemolíticas con morfología al Gram de cocos grampositivos y las pruebas de la catalasa y la hidrólisis del L-Pyrrolidonyl- β -Naftilamida (PYR) negativas, fueron consideradas sugerentes de neumococos. Estas colonias se seleccionaron y, a partir de ellas, se realizaron subcultivos para proseguir con su identificación preliminar, la cual se fundamentó en la susceptibilidad a la optoquina (BBL) de acuerdo a lo descrito por Gardam y col. (5). La biotipificación se realizó mediante la prueba de solubilidad en bilis según los criterios de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (6) y la aglutinación en látex (Wellcogen® *S. pneumoniae*), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La serotipificación se realizó por la reacción de Quellung, utilizando los antisueros fabricados por el Serum Institut Copenhagen, Dinamarca, de acuerdo a lo descrito por la OPS (6).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada mediante el método de microdilución en caldo para los siguientes antibióticos: penicilina, ceftriaxona, cefotaxima, cefepima, doxiciclina, rifampici-

na, eritromicina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol, ofloxacina y vancomicina, utilizando caldo Mueller Hinton No. 2 ajustado y con cationes (Oxoid), suplementado con 5% de sangre de caballo lisada y centrifugada de acuerdo a los criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (7). La cepa control utilizada fue *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Se utilizó la nitrocefina (Oxoid) como sustrato de las β -lactamasas y la técnica de detección colorimétrica descrita por O'Callaghan y col. (8), para determinar cualitativamente la presencia de β -lactamasas en las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los agentes β -lactámicos.

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 7.5. Los resultados fueron analizados mediante la aplicación de la prueba de Chi Cuadrado.

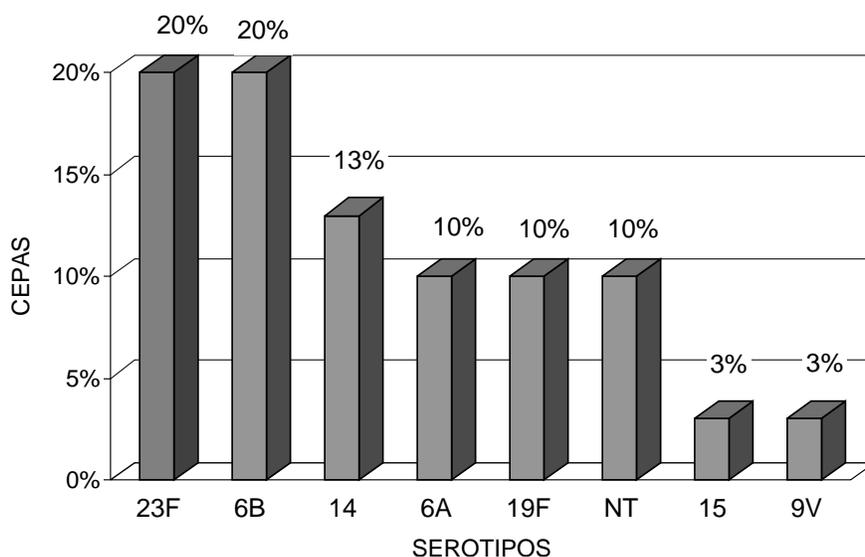
RESULTADOS

Un total de 125 niños fueron seleccionados para el estudio. De estos, la edad pro-

medio fue de 26 meses, el 55% estuvo representado por individuos del sexo masculino, el 42% se ubicó en el estrato socioeconómico tipo IV (clase obrera) y el 38% de los niños asistía a hogares de cuidado diario o preescolares. Desde el punto de vista clínico, destacó que el 35% de los niños tenía antecedentes de alergias y el 43% había recibido tratamiento con antibióticos tres meses previos al muestreo. Por otra parte, en el 31% de los casos estudiados se diagnosticó una infección respiratoria aguda en el momento del estudio, mientras que el 32% presentó infección respiratoria de carácter recurrente. Sólo en el 24% del total de muestras analizadas, se aislaron cepas de *S. pneumoniae*. La frecuencia de recuperación de estas cepas estuvo asociada principalmente a la infección respiratoria recurrente (41%, $p=0,009$) (datos no mostrados).

Sólo el 90% de estas cepas pudo ser tipificado, y los serotipos más frecuentes fueron 23F (20%), 6B (20%) y 14 (13%) (Fig. 1).

Entre las cepas de *S. pneumoniae* el 73% mostró resistencia a por lo menos uno de los antibióticos evaluados, y los marca-



NT: no tipificable

Fig. 1. Distribución de los tipos serológicos en 30 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños menores de 5 años.

dores de resistencia más frecuentes fueron doxiciclina (60%), penicilina (47%) trimetoprim/sulfametoxazol (37%) clindamicina (37%), eritromicina (30%), cloramfenicol (23%), ceftriaxona (7%) y cefepima (3%). Todas las cepas fueron sensibles a la cefotaxima, ofloxacina, rifampicina y vancomicina. Destaca el hecho de que entre las cepas resistentes a la penicilina, el 3% estuvo constituido por fenotipos de alta resistencia ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, en ninguna de estas cepas se le detectó la producción de β -lactamasas (datos no mostrados). Por

otra parte, 36% de las cepas de *S. pneumoniae* fueron multirresistentes. Los patrones de resistencia más frecuentemente observados fueron PNC-ERI-TMP/SMX-DOX-CLO-CLI y PNC-DOX con 16,59% y 13,27% respectivamente (Tabla I).

El serotipo que con mayor frecuencia se asoció a uno o más marcadores de resistencia fue el 6B, siguiéndole en orden de frecuencia, el 6A, 15, 14, 23F, 19F y el 9V. La multirresistencia predominó en los serotipos 6B, 6A y 15. Los serotipos asociados con resistencia a la penicilina y a una de las

TABLA I
PATRONES DE RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS Y TIPOS SEROLÓGICOS DE 30 CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae* AISLADAS DE PORTADORES NASALES PEDIÁTRICOS

Marcadores de resistencia	No. de cepas	%	Tipos serológicos	Patrones de resistencia
Resistencia a 1 antimicrobiano	5	17	6 A	PNC
			19F, NV	D*
			23F, 9V	TMP
Resistencia a 2 antimicrobianos	6	20	23F, 23F, 23F, 23F	PNC + D*
			14	PNC + TMP/SMX*
			19F	D* + Cli
Resistencia a 3 o más antimicrobianos	11	36	14	PNC + D* + Cli
			NT, 14	E* + D* + Cli
			6A	TMP/SMX + D* + Cli
			15, 6B, 6B, 6B, 6B	PNC + E* + TMP/SMX* + D* + Clo* + Cli
			6A	PNC + Ceft + E* + TMP/SMX* + D* + Clo* + Cli
			6B	PNC* + Ceft + Cefe + E* + TMP/SMX* + D* + Clo* + Cli
Subtotal resistencia a 1 o más antimicrobianos	22	73		
Ninguno	8	27	19F, 6B, NV, 23F, 14, NT, NT, NV	

*: Resistencia alta. PNC: Penicilina. E: Eritromicina. TMP/SMX: Trimetoprim/Sulfametoxazol. D: Doxiciclina. Clo: Cloramfenicol. Cli: Clindamicina. Ceft: Ceftriaxona. Cefe: Cefepima. NT: no tipificable. NV: no viable.

cefalosporinas probadas fueron el 6A y el 6B (Tabla I).

De todos los factores clínicos y epidemiológicos estudiados se pudo observar que la distribución de los neumococos resistentes predominó en el grupo de niños que habían recibido tratamiento previo con antibióticos (Fig. 2). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico se demostró que la asociación del antecedente de tratamiento con antibióticos y el aislamiento de *S. pneumoniae* resistente fue significativo solamente para aquellos niños portadores de neumococos con marcadores de resistencia a la penicilina y al cloramfenicol ($p < 0,05$).

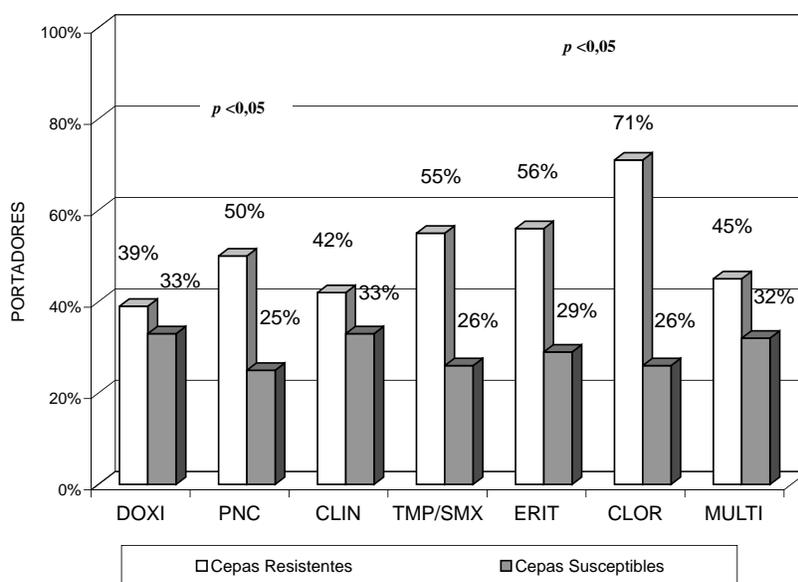
DISCUSIÓN

La frecuencia de aislamiento y la distribución de serotipos de *S. pneumoniae* en portadores nasales es muy variable, dependiendo de la edad, área geográfica y condiciones socioeconómicas (4). En este estudio, el porcentaje de aislamiento de *S. pneumoniae* fue de 24%, con una asociación

altamente significativa a la infección respiratoria recurrente. Por consiguiente, el antecedente de infecciones respiratorias recurrentes fue un factor de riesgo que favoreció la colonización nasal de cepas de *S. pneumoniae* en la población estudiada.

La mayoría de las cepas de neumococos aisladas pertenecieron a los serotipos 6B, 23F y 14. La distribución de los serotipos fue muy similar a la hallada en Estados Unidos, Grecia y Vietnam (4). Por el contrario, Sniadack y col., citados por Rubin (9), han afirmado que los serotipos más frecuentemente aislados en los países en vías de desarrollo son los neumococos pertenecientes a los serotipos 5 y 1; sin embargo, estos serotipos no fueron detectados en las cepas aisladas.

Los marcadores de resistencia más frecuentemente observados fueron los de la doxiciclina y la penicilina. En este último, el fenotipo predominante lo constituyó el de la resistencia intermedia. Estos resultados fueron superiores a los reportados en otras localidades, tal es el caso de las tetra-



DOXI: Doxiciclina. PNC: Penicilina. ERIT: Eritromicina. TMP/SMX: Trimetoprim-Sulfametoxazol. CLIN: Clindamicina. CLOR: Cloramfenicol. MULTI: Multirresistentes

Fig. 2. Niños con antecedentes de tratamiento con antibióticos portadores de neumococos susceptibles y resistentes a los agentes antimicrobianos.

ciclina en Grecia (29%) y en la República Central Africana (42,3%) (10), y la resistencia a la penicilina en Grecia, Vietnam y Estados Unidos con un 24, 34 y 33% respectivamente (4, 11, 12).

Hasta el momento, en Venezuela no se conocen registros sobre la frecuencia de *S. pneumoniae* en portadores nasales, ni la distribución de sus patrones de resistencia. Sin embargo, Gómez y col. (13) reportaron que de 66 cepas de *S. pneumoniae* provenientes de casos clínicos el 15,1% mostró resistencia a la penicilina. Otro estudio realizado por el grupo venezolano de vigilancia de la resistencia bacteriana demostró que para el año 2002, el 28,7% de las cepas *S. pneumoniae* recolectadas en varios hospitales del país fueron resistentes a la penicilina (14).

Es probable que la resistencia a la penicilina detectada en las cepas analizadas, sea consecuencia del uso indebido de ésta en infecciones respiratorias no bacterianas. Algunos autores han sustentado que los serotipos más frecuentemente asociados con la resistencia a la penicilina son el 6, 9, 14, 19 y 23 (9, 15). Sin embargo, en este estudio los serotipos de neumococos comúnmente vinculados con la resistencia a la penicilina fueron el 6B y 23F.

Por otra parte, en ninguna de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas resistentes a los agentes β -lactámicos se detectó la producción de β -lactamasas. Posiblemente, el mecanismo de resistencia en estos neumococos esté relacionado con la presencia de proteínas fijadoras de la penicilina (PBP) con reducida afinidad a los β -lactámicos (16). Las modificaciones de las proteínas PBP1a y 2x median la resistencia a las cefalosporinas de 3era. generación. Estas alteraciones en las PBP son codificadas en un gen "mosaico", cuya expresión total o parcial dependerá de la presión selectiva que ejerzan los antibióticos β -lactámicos que estén en uso y de la inhibición de un gen represor

que permita la expresión fenotípica de un patrón de resistencia particular (17,18). Esta afirmación explicaría el perfil de resistencia que presentaron los serotipos 6A y 6B, los cuales fueron resistentes a la ceftriaxona y la cefepima, pero sensibles a la cefotaxima. Hallazgos similares han sido reportados por Laible y col. (18), Johnson y col. (19) y Coffey y col. (20), quienes determinaron por genotipificación las diferencias en los patrones de resistencia a los agentes β -lactámicos en cepas de *S. pneumoniae* R6 y en mutantes resistentes al cefotaxime C506.

No se detectaron cepas resistentes a la ofloxacina ni a la rifampicina, hallazgo que se correspondió con la baja prevalencia de resistencia a estas drogas en neumococos en el ámbito mundial (21, 22). De igual forma, coincidiendo con los datos internacionales disponibles, en este estudio no se observaron cepas resistentes a la vancomicina (23, 24).

La frecuencia más elevada de multiresistencia reportada en *S. pneumoniae* (50-70%) se ha descrito en España y Sur África (25), Hungría y Korea (26). En este estudio, la frecuencia de multiresistencia fue inferior a la reseñada en esos países (36%), pero superior a la documentada en Taiwan (31%), Vietnam (32%) y en Estados Unidos (20%) (11, 12, 25).

Los resultados de este estudio revelaron que los serotipos más frecuentemente asociados con resistencia múltiple fueron el 6 y el 14. El 32% de las cepas resistentes mostraron resistencia a 6 o más agentes antimicrobianos y casi todas pertenecían al serogrupo 6. De manera similar, se ha reportado que los serotipos 6B, 14, 19F y 23F están asociados a clonas de neumococos multiresistentes a drogas (27, 28). No obstante, en este estudio, el serotipo 23F no presentó ningún patrón de multiresistencia.

El tratamiento con antibióticos durante 3 meses antes del muestreo constituyó el único factor de riesgo estadísticamente significativo para portar neumococos resistentes

tes a la penicilina y al cloramfenicol. Estas observaciones avalan lo descrito en los estudios epidemiológicos, en los que se ha encontrado que el tratamiento con antibióticos es el factor de riesgo más importante para portar neumococos resistentes (12).

En conclusión, el perfil serológico de las cepas de *S. pneumoniae* analizadas, se distribuyó entre los serotipos 23F, 6B y 14. De éstos, el 23F y el 6B se asociaron con mayor frecuencia a patrones de multirresistencia.

Este es el primer trabajo realizado en Mérida, Venezuela, que ha permitido conocer la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* y su relación con la resistencia a antibióticos en niños portadores nasales menores de 5 años provenientes de un área urbana. Los resultados obtenidos proporcionarán información en el ámbito local para orientar la terapéutica empírica de las infecciones producidas por los neumococos, el uso racional de los antibióticos en la práctica clínica y las estrategias a aplicar para una vacunación adaptada a los serotipos que con mayor frecuencia se asocian con la resistencia a los agentes antimicrobianos en la población infantil.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las Lic. Enza Espadola y Damaris Sánchez del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" por su asesoramiento técnico en la serotipificación de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y a la Lic. Solbey Morillo por la asistencia técnica en el análisis estadístico.

Este trabajo fue parcialmente financiado por FONACIT No. F-2000001633 y el CDCHT código: ADG FA-02-97.

REFERENCIAS

1. Artz A, Ersjler W, Longo D. Pneumococcal vaccination and revaccination of older adults. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2):208-318.
2. WHO. State of the art of new vaccines: research & development: Acute respiratory infections, Bacterial respiratory infections, *Streptococcus pneumoniae* 2004. Available from: http://www.who.int/vaccine_research/documents/new_vaccines/en/index2.html.
3. Shimada J, Yamaka N, Hotomi M, Suzumoto M, Sakai A, Ubukata K, Mitsuda T, Yokota S, Faden H. Household transmission of *Streptococcus pneumoniae* among siblings with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 2003; 40(5):1851-1853.
4. Bogaert D, Groot R, Hermans P. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:144-154.
5. Gardam M, Miller M. Optochin revisited: Defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3):833-834.
6. Organización Panamericana de la Salud. Manual de *Streptococcus pneumoniae*. Taller sobre la identificación bioquímica y serológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Santa Fe de Bogotá- Colombia. 1998. p 19-23
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. MIC testing. Supplemental tables M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Wayne, PA.
8. O'Callagan C, Morris A, Kirby S, Shingler A. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 1:283-288.
9. Rubin L. Vaccine pneumococcal. In: Lutwick L, Rubin L. (Eds) *Pediatric Clin North Amer* 2000; 47(2):269-285.
10. Domínguez A, Pallares R. Antibiotic resistance in respiratory pathogens. *Current Opinion Infect Dis* 1998; 11:139-145
11. Parry C, Song T, Wain J, Tuyet N, Gainsborough M, Nga D, Davies C, Hoan N, Tinh T, White N, Farrar J. Nasal carriage in Vietnamese children of *Streptococcus pneumoniae* resistant to multiple

- antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3):484-488.
12. Finkelstein J, Huang S, Daniel J, Rifas S, Kleinman K, Glodman D, Pelton S, Demaria A, Platt R. Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine era: predictors of carriage in a multicomunity sample. *Pediatrics* 2003; 112(4):862-869.
 13. Gómez M, Galindo D, Medina G, Cedeño M, Priscelli A. Sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina y cefalosporinas. *Bol Soc Ven Microbiol* 1999; 19(1):17-20.
 14. Grupo Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. período julio 2001-diciembre 2002. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 23(1):89-97.
 15. Meats E, Brueggemann A, Enright M, Sleeman K, Griffiths D, Crook D, Spratt B. Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 386-392.
 16. Zhao G, Meier T, Hoskins J, McAllister K. Identification and characterization of the penicillin-binding-protein 2a of *Streptococcus pneumoniae* and its possible role in resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(6): 1745-1748.
 17. Hermans PW, Sluijter M, Dejsirilert S, Lemmens N, Elzenaar K, van Veen A, Goessens WH, de Groot R. Molecular epidemiology of drug-resistant pneumococci: toward an international approach. *Microb Drug Resist* 1997; 3:243-251.
 18. Laible G, Hakenbeck R, Sicard MA, Joris B, Ghuyssen JM. Nucleotide sequences of *pbpX* genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from *Streptococcus pneumoniae* R6 and a cefotaxime-resistant mutant C506. *Mol Microbiol* 1989; 3: 1337-1348.
 19. Johnson D, Doern G, Haugen T, Hindler J, Washington J, Jones R. Comparative activity of twelve beta-lactam drugs tested against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from five medical centers: effects of serum protein and capsular material on potency and spectrum as measured by reference test. *Diagn Microb Infect Dis* 1996; 25:137-141.
 20. Coffey Tj, Enright MC, Daniels MT, Dowson CG, Hutchison A, Spratt BG. Serotype 19A variants of the Spanish serotype 23F multiresistant clone of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 1998; 4:51-55.
 21. Johnson C, Benjamín W, Moser S, Hollingshead S, Zheng X, Crain M, Nahm M, Waites K. Genetic relatedness of levofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from North America. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2458-2464.
 22. Stutzmann P, Utz S, Aebi S, Mühlemann K. Low-level resistance to rifampicin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(3):863-868.
 23. McCullers J, Keith B, Novak R. Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from cerebrospinal fluid of patient who developed recrudescence meningitis. *J Infect Dis* 2000; 181:369-373.
 24. Jones R, Biedenbach D, Beach M. Influence of patient age on the susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolates in North America (2000-2001): report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46:77-80.
 25. Dejsirilert S, Overweg K, Sluiter M; Saengsuk L, Gratten M, Ezaki T, Hermans P. Nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children with acute respiratory tract infections in Thailand: a molecular epidemiological survey. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1832-1838.
 26. Overweg K, Hermans P, Trzcinski K, Sluijter M, de Groot R, Hryniewicz W. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: Identification of emerging clones. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1739-1745.
 27. Zhou J, Enright M, Spratt B. Identification of the major Spanish clones of penicillin-resistant pneumococci via internet us-

- ing multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):977-986.
28. Watanabe H, Asoh N, Hocino K, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sancha, T, Kunsulkmengral K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Anti-microbial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* and molecular characterization of multidrug-resistant serotype 19F, 6B, and 23F pneumococci in Northern Thailand. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9):4178-4183.