

**RESISTENCIA DE *Streptococcus pneumoniae* A PENICILINA,
ERITROMICINA Y CLINDAMICINA EN EL HOSPITAL CÓRDOBA.**

Reinoso Fernando Daniel

Minoli María Jimena

Aiassa María Susana

Garutti Alicia Beatriz

Mosconi Susana Graciela

Mena Javier Alberto

Spesso María Florencia

Dotto Gladys

Área microbiología - Servicio de Bioquímica del Hospital Córdoba, Córdoba Argentina.

Correspondencia: Fernando Daniel Reinoso. Mail: fernandoreinoso@outlook.com.

Tel: 0351-156197631

Aceptado para su publicación: 10/1/17

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae (*Spn*), es el agente etiológico de aproximadamente el 60% de las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad; es el segundo agente causal de meningitis bacteriana en la población adulta y de más de la mitad de casos de otitis media aguda en la población infantil a nivel mundial. En las últimas décadas se ha incrementado de manera drástica su resistencia a los antimicrobianos como los β -lactámicos, macrólidos, azálidos y lincosaminas. Se estudiaron en forma retrospectiva-observacional entre el 1 de Julio de 2014 y 31 de Diciembre de 2015 en adultos, todas las cepas de *Spn* aisladas de muestras respiratorias, hemocultivos, líquido ascítico, líquido pleural, orina y exudado de córnea. Del total de 49 cepas estudiadas, un 2,00% mostró resistencia a penicilina, no observándose resistencia a cefotaxima o ceftriaxona. Un 36,70% presentó resistencia a macrólidos, con una predominancia del fenotipo M. Se comprobó que los antimicrobianos β -lactámicos, continúan siendo los más adecuados para tratamientos de primera línea, mientras que macrólidos deberían utilizarse con precaución por el alto porcentaje de resistencia.

Palabras claves: *Streptococcus pneumoniae*, adultos, antimicrobianos.

INTRODUCCION

Streptococcus pneumoniae (*Spn*) se encuentra en la microbiota normal del tracto respiratorio superior humano, aislándose en un 5-70% de la población adulta sana (1-3). En los últimos años se han producido cambios importantes en la epidemiología de la infección neumocócica. En primer lugar, el incremento de la prevalencia de dichas infecciones en determinados grupos de riesgo, como los pacientes mayores de 65 años, pacientes VIH+ y aquellos que presentan enfermedades debilitantes crónicas. *Spn* es el agente etiológico más comúnmente implicado en la neumonía extra hospitalaria (teniendo una incidencia estimada de 68-260 casos cada 100.000 habitantes por año), la meningitis bacteriana y la otitis media

(población infantil) y es poco frecuente como agente causal de endocarditis, artritis séptica, peritonitis y de otras enfermedades infecciosas (1,2,4-7). En 2005 la OMS (Organización Mundial de la Salud) estimó las muertes por infecciones debidas a *Spn*, en más de un 1 millón de personas por año, sobre todo en países en desarrollo, pronosticando un incremento de este número debido a la resistencia a los antimicrobianos de elección (8).

La versatilidad adaptativa del microorganismo le ha permitido crear mecanismos capaces de sobreponerse a las agresiones terapéuticas con un grado variable de eficacia (2, 4, 5). La resistencia a la penicilina tiene una mayor prevalencia en la población pediátrica (9, 10). Esta se debe a modificaciones en las PBPs (*PenicilinBindingProteins*), siendo las más afectadas 1a, 2a, 2b y 2x, donde *Spn* adquiere material genético de otras bacterias con las que coexiste íntimamente, como son los estreptococos del grupo *viridans* de la nasofaringe (11-16).

La resistencia a macrólidos es la más prevalente debido a su utilización en terapias empíricas, sobre todo en neumonías adquiridas de la comunidad (17-19). La resistencia se da principalmente por dos mecanismos, como es la modificación del sitio target por metilación del ARNr 23S producida por el gen *ermB*, confiriendo resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptogramina B, generando un fenotipo constitutivo o inducible (MLSbc/MLSbi). El gen *mefA* codifica proteínas que actúan como bombas de eflujo, afectando solo a macrólidos, generando el fenotipo M (14,18-26).

Este estudio se diseñó con el objetivo de determinar la presencia de los mecanismos de resistencia a eritromicina, clindamicina y penicilina, en cepas de *Spn* aisladas en pacientes adultos en un periodo de 18 meses.

MATERIALES Y METODOS

Sitio de estudio y población estudiada.

Se ideó un estudio retrospectivo-observacional entre el 1 de Julio del 2014 y 31 de Diciembre del 2015 en el Hospital Córdoba, donde se estudiaron las 49 cepas aisladas de pacientes adultos, de diferentes tipo de muestras biológicas estériles como hemocultivos, líquidos cefalorraquídeos, líquido pleural, líquido ascítico, exudado de córnea y orina, y muestras no estériles como esputo y aspirado traqueal.

Aislamiento bacteriano.

Las muestras fueron sembradas en agar sangre de carnero desfibrinada y cultivadas por 24hs a 35°C al 5% de CO₂. *Spn* fue identificado por la α -hemólisis de la colonia en el cultivo, por coloración de Gram, por pruebas bioquímicas como la sensibilidad a Optoquina (OPT) y solubilidad en bilis (5,27). Además también fueron tipificadas mediante sistemas automatizados como Phoenix (BectonDickson, EE.UU.) y Vitek2 Compac (Biomerieux, Marcy-l'Étoile Francia).

Test de sensibilidad antimicrobiana.

Los aislamientos fueron testeados frente a un conjunto de antimicrobianos, que incluían oxacilina de 1µg (OXA) para evaluar sensibilidad a penicilina (PEN), eritromicina de 15µg (ERI), clindamicina de 2µg (CLI), levofloxacina de 5µg (LEV), vancomicina de 30µg (VAN), trimetoprin-sulfometoxazol de 1,25/23,75µg (TMS), tetraciclina de 30µg (TET) y cloranfenicol 30µg (CHO), por la metodología de Kirby-Bauer (difusión en placa) utilizando agar Muller-Hinton con sangre ovina al 5% (Biomerieux, Marcy-l'Étoile Francia y Hemo G de Gribaudo). El inóculo bacteriano fue preparado por suspensión directa de colonias puras de cultivo de 18-24hs, en caldo de Mueller-Hinton y ajustado a una turbidez equivalente a 0,5 MacFarland. Las placas fueron incubadas durante 18-24hs a 35°C en una atmósfera de 5% CO₂. Junto con la tipificación se obtuvo el correspondiente antibiograma por los sistemas automatizados de Phoenix BD y Vitek2 Compac; además se utilizó la técnica E-test (Gold-

Standard) para determinar en paralelo con los sistemas automatizados la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) a PEN, en los casos donde los halos de inhibición para OXA eran ≤ 20 mm.

Los resultados de difusión en placa y de CIM fueron interpretados de acuerdo a las guías CLSI 2015 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y controlados utilizando la cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) *S.pneumoniae* 49619 (6, 8, 13, 28-30). Los criterios de interpretación para CIM en aislamientos no meníngeos y meníngeos se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1: CIM para aislamientos no meníngeos.

ANTIMICROBIANOS	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Penicilina	$\leq 2\mu\text{g/ml}$	$= 4\mu\text{g/ml}$	$\geq 8\mu\text{g/ml}$
Ceftriaxona (CRO)	$\leq 1\mu\text{g/ml}$	$= 2\mu\text{g/ml}$	$\geq 4\mu\text{g/ml}$
Cefotaxima (CTX)	$\leq 1\mu\text{g/ml}$	$= 2\mu\text{g/ml}$	$\geq 4\mu\text{g/ml}$
Clindamicina	$\leq 0,25\mu\text{g/ml}$	$= 0,5\mu\text{g/ml}$	$\geq 1\mu\text{g/ml}$
Eritromicina	$\leq 0,25\mu\text{g/ml}$	$= 0,5\mu\text{g/ml}$	$\geq 1\mu\text{g/ml}$

Tabla 2: CIM para aislamientos meníngeos.

ANTIMICROBIANOS	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Penicilina	$\leq 0,06\mu\text{g/ml}$	-	$\geq 0,12\mu\text{g/ml}$
Ceftriaxona	$\leq 0,5\mu\text{g/ml}$	$= 1\mu\text{g/ml}$	$\geq 2\mu\text{g/ml}$
Cefotaxima	$\leq 0,5\mu\text{g/ml}$	$= 1\mu\text{g/ml}$	$\geq 2\mu\text{g/ml}$

El fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLSB) se determinó por la prueba de difusión utilizando discos de ERI y CLI enfrentados a una distancia de 15mm de centro a centro de los discos (31). Esta metodología permite

diferenciar la resistencia MLSB inducible y constitutiva del mecanismo de eflujo (M). Se consideró fenotipo MLSBc cuando se observó resistencia (halos $\leq 15\text{mm}$) para ERI y CLI simultáneamente, en tanto que el fenotipo MLSBi cuando fue resistente a ERI y sensible a CLI (halo $\geq 19\text{mm}$) con achatamiento de su halo de inhibición (D-test). Se determinó fenotipo M cuando fue resistente a ERI y sensible a CLI sin achatamiento de su halo (3,9,13,30). La sensibilidad o resistencia a ERI se extrapoló a otros macrólidos (claritromicina) y azálidos (azitromicina) (9).

RESULTADOS

El 55% de las cepas estudiadas se aislaron de muestras estériles como hemocultivo (n=18), líquido pleural (n=1), líquido ascítico (n=2), LCR (n=3), exudado de córnea (n=1) y orina (n=2); mientras que el 45,00% de las cepas se aislaron de muestras no estériles como esputo (n=8) y aspirado traqueal (n=14). Sólo un 10,20% de las cepas estudiadas provenían de consultorio externo y el 89,90% de origen intrahospitalario. La distribución de cada tipo de muestras por servicio se describe en el Gráfico I. En la población intrahospitalaria predominaron los hemocultivos con el 40,90% y en la población ambulatoria la supremacía fue compartida por esputo (n=2) y orina (n=2) con el 40,00% cada una.

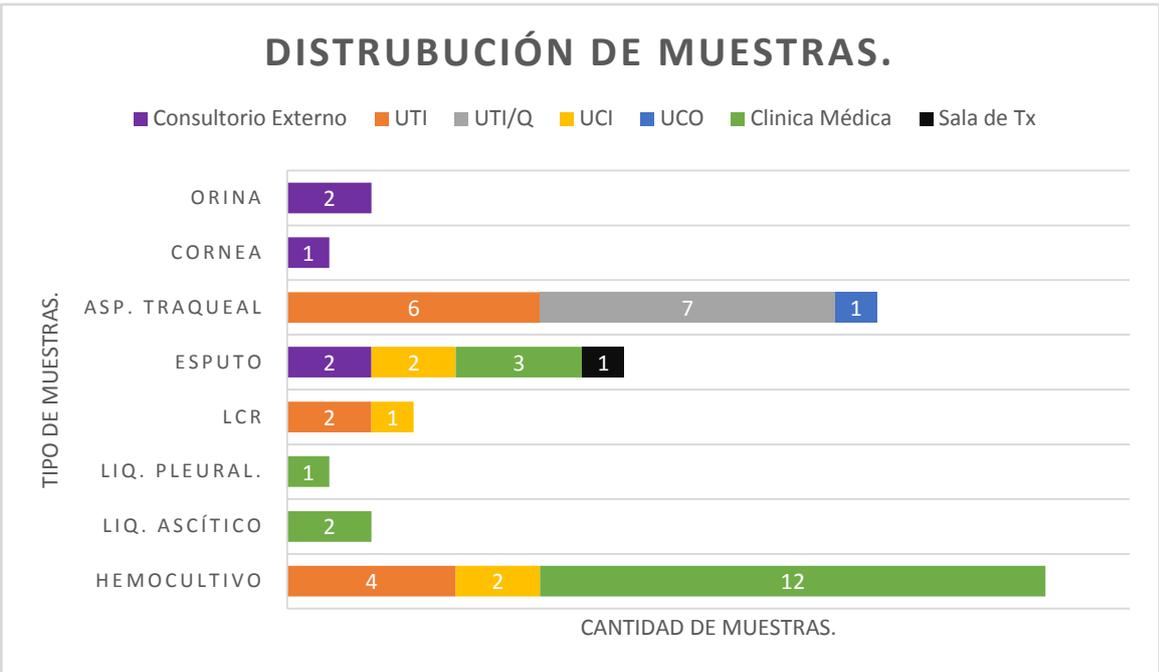
La resistencia a ERI y CLI se observó en un 28,50% (n=14) y 8,16% (n=4) respectivamente, del total de cepas estudiadas. Obteniéndose un 85,70% (n=12) resistente a ERI con una CIM=4 $\mu\text{g/ml}$ y un 14,30% (n=2) con una CIM=2 $\mu\text{g/ml}$; mientras que para CLI se obtuvo un 100% de resistencia con una CIM=2 $\mu\text{g/ml}$. En el Gráfico II se muestran los fenotipos observados. La resistencia a ERI (CIM=4 $\mu\text{g/ml}$, halo de inhibición $\leq 15\text{mm}$) aumentó cuando hubo sensibilidad disminuida a PEN, siendo que el 7,14% (n=1) de las cepas compartían resistencia a ambos antimicrobianos.

Dentro de las muestras no estériles, el 12,50% (n=1) de las cepas aisladas de esputo fue resistente a PEN y el 62,50% (n=5) resistente a ERI por medio del fenotipo M; mientras

que el 21,40%(n=3) de las cepas provenientes de aspirados traqueales fueron resistentes a ERI y CLI por medio del fenotipo MLSBc. De las muestras estériles el 16,60% (n=3) de las cepas aisladas de hemocultivos fueron resistentes a ERI por el fenotipo M y el 5,50% (n=1) resistente a ERI y CLI por el fenotipo MLSBc; mientras que para líquido pleural y líquido ascítico fue 100% (n=1) y 50% (n=1) respectivamente, resistentes a ERI por el fenotipo M.

En el servicio de Clínica Médica se obtuvo el mayor porcentaje de resistencia a ERI (50%), donde el 85,70% (n=6) de las cepas expresaban el fenotipo M y el 14,30% (n=1) el fenotipo MLSBc. Mientras que Consultorio Externo tuvo el mayor porcentaje de resistencia a CLI (50%).

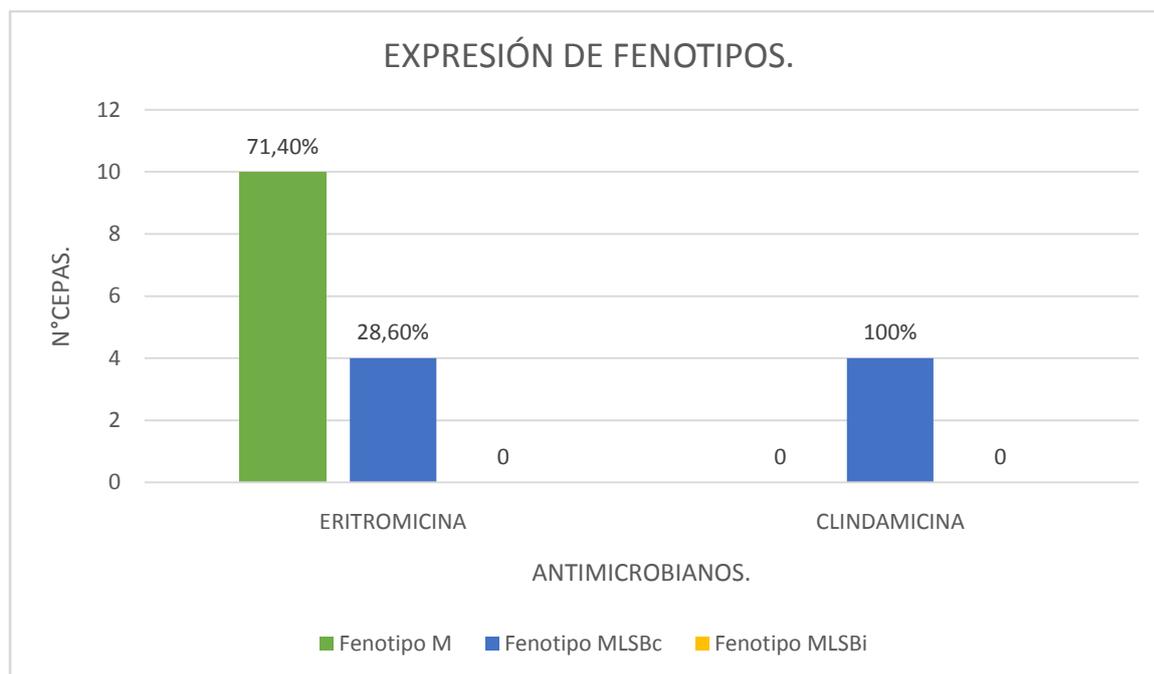
Grafico I: Distribución de muestras por servicio.



UTI: Unidad de Terapia Intensiva; UTI/Q: Unidad de Terapia Intensiva del Instituto del Quemado; UCI: Unidad de Cuidados Intermedios; UCO: Unidad Coronaria; Sala de Tx: Sala de Transpalnte.

Durante el periodo examinado, el 2,00% (n=1) de las cepas mostró resistencia de alto grado a PEN (CIM=8µg/ml, halo de inhibición ≤20mm) proveniente de muestras no estériles (esputo) de Consultorio Externo; esta cepa al igual que las 48 restantes fueron sensibles a CRO y CTX.

Grafico II: Antimicrobianos y mecanismos relacionados.



DISCUSION

Los esfuerzos para tratar enfermedades neumocócicas en adultos y niños han producido un aumento en la resistencia a los antimicrobianos, debido en parte a las presiones selectivas ocasionadas por su uso indiscriminado, y a la expansión y propagación de cepas multirresistentes (11,13,15,17,26,29,31-34).

En los estudios de vigilancia epidemiológicos mundiales se demuestra que *Spn* presenta, entre el 8,40% y 20,70% de resistencia de alto nivel ($CIM \geq 8 \mu\text{g/ml}$) (9,29,35,37,38). En nuestro estudio se observó una sola cepa con resistencia de alto grado, esto podría deberse a que las tasas de resistencia de *Spn* en Argentina son bajas en comparación con países como España que tiene una de las mayores tasas de resistencia a antimicrobianos en el mundo, y además en la población adulta el aislamiento de *Spn* es menor en comparación a la población pediátrica.

Las cepas susceptibles a PEN son rara vez resistentes a otros antimicrobianos, mientras que las que son resistentes, es probable que lo sean a múltiples antimicrobianos, especialmente a macrólidos(12,24,39-42).El aumento de resistencia a macrólidos se debe a luso indiscriminado de antimicrobianos diferentes a los β -lactámicos (18,30,33,39). Saldías y col. en 2005 obtuvieron un 21% de resistencia a ERI (38). Weyland y col. en 2011, obtuvieron un 20,3% de resistencia, con un 83% de prevalencia del fenotipo M y un 17% del fenotipo MLSbc/i (9). Ramos y col. en 2013 exhibieron un 62,7%, 2,7% y 34,6% de fenotipos MLSBc, MLSBi y M, respectivamente (43).En nuestro estudio se observó, que el 36,6% de las cepas estudiadas tenían resistencia a ERI y CLI por diferentes mecanismos, teniendo prevalencia el fenotipo M por sobre el fenotipo MLSbc/i del total de cepas aisladas; lo que correlacionaría con un predominio del genotipo *mefA* sobre el genotipo *ermB*. En semejanza a lo observado en EEUU, Alemania y Finlandia donde el 85% de resistencia está dado por el fenotipo M, no así como en otros países de Europa, Asia y Sud África donde la prevalencia del fenotipo MLSbc/i se da en el 70% de los aislamientos (9).

Como conclusión, *Spn* continúa incrementando su resistencia a agentes antimicrobianos comunes, limitando las opciones terapéuticas y aumentando el potencial de fallas en el tratamiento, constituyéndose en un grave problema de salud pública, lo cual está siendo considerado en las recomendaciones internacionales para el manejo de las infecciones del sistema nervioso central y el tracto respiratorio inferior (38). Determinando en este estudio que los β -lactámicos como PEN, continúan siendo los antibióticos más adecuados para el tratamiento empírico y que CTX o CRO podrían ser utilizadas como alternativas terapéuticas, en caso que haya resistencia a PEN, sobre todo de infecciones respiratorias. Mientras que los macrólidos deberían utilizarse con precaución por el alto porcentaje de resistencia hallado.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Tubau.F, Liñares.J, Martín.R. Resistencia antibiotica en *Streptococcus pneumoniae*. En <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas>; consultado 18/01/2015.
- 2- Sanabria G. Correlación de serotipos, sensibilidad y resistencia antimicrobiana en niños con infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae* en un centro de referencia de Asunción-Paraguay. Revisión de 6 años. Rev. Inst. Med. Trop 2009;4: 14-24.
- 3- Azadegan A, Ahmadi A, Lari AR, Talebi M. Detection of the Efflux-Mediated Erythromycin Resistance Transposon in *Streptococcus pneumoniae*. *Annals of Laboratory Medicine*. 2015;35:57-61.
- 4- Noda Albelo, AL; Vidal Tallet, LA; Vidal Casal, JI y Hernandez Alvarez L. Utilización de la penicilina en la infección extrameningea por *Streptococcus pneumoniae*. Rev Cubana Pediatr 2011; 83:405-12.
- 5- Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. WHO 2003. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6. Atlanta, Georgia: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades; Switzerland: Organización Mundial de la Salud, 2004.
- 6- Nakano S, Fujisawa T, Ito Y, Chang B, Suga S, Noguchi T, Yamamoto M, Matsumura Y, Nagao M, Takakura S, Ohnishi M, Ihara T, Ichiyama S. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in paediatric patients after the introduction of 13-valent conjugate vaccine in a nationwide surveillance study conducted in Japan in 2012–2014. Elsevier Ltd 2016; 34: 67-76.
- 7- Vestrheim DF, Høiby EA, Aaberge IS, Caugant DA. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Strains Colonizing Children Attending Day-Care Centers in Norway . *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46:2508-18.

- 8- Geng Q, Zhang T, Ding Y, et al. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children Hospitalized with Respiratory Infections in Suzhou, China. Mokrousov I, ed. PLoS ONE. 2014;9:e93752.
- 9- Weyland BS, Losada M, Molelrach M, Bonofiglio L, De Mier C, Garcia SA, Vay C, Rodriguez CH, Famiglietti A. Evaluación de la actividad de diferentes antimicrobianos frente a *Streptococcus pneumoniae* provenientes de pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad. Revista Americana de medicina respiratoria 2011; 11:117-24.
- 10- Bantar C, Curcio D, Jasovich A, Bagnulo H, Arango A, Bavestrello L. Neumonía aguda adquirida en la comunidad en adultos: Actualización de los lineamientos para el tratamiento antimicrobiano inicial basado en la evidencia local del Grupo de Trabajo de Sudamérica (ConsenSur II). Rev. Chil. Infectol 2010; 27: 9-38.
- 11- Del Castillo Martín F. Neumococo resistente a la penicilina. Un grave problema de salud pública. An Esp Pediatr 1996;45:233-35.
- 12- Picazo JJ, Betriu C, González Romo F. Microbiología de las infecciones neumocócicas. Resistencia a los antibióticos. An Pediatr, Monogr 2003;1:3-13.
- 13- Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torre C. Detección Fenotípica de Mecanismos de resistencia en Gram-positivos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. En:<https://www.seimc.org/contenidos/.../seimc-procedimientomicrobiologia39>; consultado 02/05/2016.
- 14- Liu Z, Nachamkin I, Edelstein PH, Lautenbach E, Metlay JP. Serotype Emergence and Genotype Distribution among Macrolide-Resistant Invasive *Streptococcus Pneumoniae* Isolates in the Postconjugate Vaccine (PCV-7) Era. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012;56:743-50.
- 15- Ruiz J, Simarro E, Gómez J. Resistencias y tratamiento de *Streptococcus pneumoniae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001;19:191-5.

- 16- Moreno MC, González ER, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 2009; 69: 185-192.
- 17- Portillo A, Lantero M, Zarazaga M, Gastañares MJ, Olarte I, Undabeitia E, Ruiz-Larrea F, Torres C. Resistencia a antibióticos Macrólidos-Lincosaminas-Streptograminas y mecanismos relacionados en cepas clínicas de *Streptococcus spp.* en La Rioja. Zumbia Monográfica, 2000; 12:11-26.
- 18- Depardieu M, Courvalin P. La mutación en el rRNA 23S responsable de la resistencia a macrólidos de 16 miembros y estreptograminas en *Streptococcus pneumoniae*. Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia 2001; 45: 319-23.
- 19- Corso A, Faccone D, Galía C, Gagetti P, Rodríguez M, Pace J, Regeira M. Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina. Revista Argentina de Microbiología 2009; 41: 29-33.
- 20- Hidalgo M, De Santos C, Duarte C, Castañeda E, Agudelo CI. Aumento de la resistencia a eritromicina en *Streptococcus pneumoniae* en Colombia, 1994-2008. Biomédica 2011;31:124-31.
- 21- Leclercq R, Courvalin P. Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia 2002; 46: 2727-34.
- 22- Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz F-J. Molecular Epidemiology of Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Europe. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43:1294-1300.
- 23- Rudolph K, Bulkow L, Bruce M, et al. Molecular Resistance Mechanisms of Macrolide-Resistant Invasive *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Alaska, 1986 to 2010. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013;57:5415-22.
- 24- Taha N, Araj GF, Wakim RH, et al. Genotypes and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Lebanon. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2012;11:2.

- 25- Mosleh MN, Gharibi M, Alikhani MY, Saidijam M, Vakhshiteh F. Antimicrobial susceptibility and analysis of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Hamadan. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2014;17:595-99.
- 26- Nielsen KL, Hammerum AM, Labertsen LM, Lester CH, Arpi M, Knudsen JD, Stegger M, Tolker-Nielsen T, Frimodt-Møller N. Characterization and transfer studies of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* from Denmark. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2010; 42:586–93.
- 27- Cortes PR, Orió AGA, Regueira M, Piñas GE, Echenique J. Characterization of In Vitro-Generated and Clinical Optochin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Argentina. Journal of Clinical Microbiology 2008;46:1930-34.
- 28- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute M100S, 26th ed. January 2016 Replaces M100-S25.
- 29- Tomic V, Dowzicky MJ. Regional and global antimicrobial susceptibility among isolates of *Streptococcus pneumoniae* and Haemophilus influenzae collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) from 2009 to 2012 and comparison with previous years of T.E.S.T. (2004-2008). Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2014;13:52.
- 30- McGee L, Pletz MW, Fobiwe JP, Klugman KP. Antibiotic Resistance of Pneumococci. In: Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C. *Streptococcus pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host-pathogen Interactions. 1st ed. Oxford, San Diego: Elsevier, 2015: 21-40.
- 31- Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2012;30:325–32.

- 32- Gómez-Barreto D, Calderón-Jaimes E, Rodríguez RS, Espinosa de los Monteros LE, Juárez M. Características clínico-microbiológicas de la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina. Salud pública Méx 1999; 41: 397-404.
- 33- Albarracín Orio AG, Paulo R. Cortes PR, Tregnaghi M, Piñas GE, Argentinean Network Pneumococcus Study Group and Echenique JR. A new serotype 14 variant of the pneumococcal Spain9V-3 international clone detected in the central region of Argentina. Journal of Medical Microbiology 2008; 57: 992–9.
- 34- Garcia-Bustos J, Tomasz A. A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1990;87:5415-19.
- 35- Feikin DR, Schuchat A, Kolczak M, et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997. American Journal of Public Health. 2000;90:223-9.
- 36- Tubau Quintano F, Pallarés Giner R. Detección de la resistencia en *Streptococcus pneumoniae* y consideraciones sobre el tratamiento antibiótico de la infección respiratoria por neumococos resistentes. En <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/neumo>; consultado 25/05/2016.
- 37- Torres A, Blasi F, Peetermans WE, Viegi G, Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33:1065–79.
- 38- Saldías P F, Flores S LJ, Torres M C, García C P, Díaz F A. Susceptibilidad a antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae* en población infantil y adulta de Santiago: Periodo 1997-2003. Rev. Méd. Chile 2005; 133: 42-9.
- 39- Falcó Ferrer V, Pahissa Berga A. Tratamiento de las infecciones por neumococos Resistentes a la penicilina en adultos. Rev Clin Esp 2003; 203:244-7.

- 40- Bonofiglio L, Regueira M, Pace J, Corso A, García E, Mollerach M. Dissemination of an Erythromycin-Resistant Penicillin-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Poland 6B-20 Clone in Argentina. *Microbial Drug Resistance* 2011, 17: 75-81.
- 41- Cortes PR, Piñas GE, Albarracín Orio AG, Echenique JR. Subinhibitory concentrations of penicillin increase the mutation rate to optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;62: 973–7.
- 42- Van Eldere J, Meekers E, Lagrou K, Massonet C, Canu A, Devenyns I, Verhaegen J, Syrogiannopoulos G, Leclercq R. Macrolide-resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Belgium. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11:4.
- 43- Ramos V, Duarte C, Díaz A, Moreno J. Elementos genéticos móviles asociados con resistencia a eritromicina en aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* en Colombia. *Biomédica* 2014; 34:209-18.