

Original

Sensibilidad *in vitro* a los antibióticos y serotipos más frecuentes de *Streptococcus pneumoniae*. Estudio multicéntrico

E. Cantón¹, N. Diosdado¹, M. Montaner¹, M. Gobernado¹ y Grupo del Estudio Multicéntrico*

¹Unidad de Bacteriología Experimental, Centro de Investigación, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia

RESUMEN

Se ha estudiado la sensibilidad y los serotipos de 211 cepas de *Streptococcus pneumoniae* procedentes de 12 hospitales españoles recogidas durante el mes de diciembre de 2003. Las pruebas de sensibilidad a ocho antibióticos se hicieron por E-test®, y la tipificación usando sueros antineumocócicos del Statens Serum Institute de Copenhague. Globalmente, los serotipos más frecuentes fueron el 19 (12,2%), 6 (10,7%), 23 (10,2%), 3 (8,1%), 9 (6,6%), 14 (6,1%) y 29 (5,1%); en sangre el 19 (16,6%) y el 14 (11,9%); y un 8,6% se etiquetaron como no tipificables. Usando los criterios del NCCLS (M7-A5), el 55,6% de las cepas fueron sensibles a la penicilina (CMI $\leq 0,06$ mg/l) y el 7,9% tuvieron resistencia elevada (CMI ≥ 2 mg/l). La sensibilidad a otros antibióticos fue del 98% al moxifloxacino, 97,1% al levofloxacino, 94,6% a amoxicilina-ácido clavulánico, 71,2% a la cefuroxima, 84,4% a la ceftriaxona y 63,1% a la claritromicina y la azitromicina. Sólo un 13,3% de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos probados. Entre las cepas no sensibles a la penicilina se observó el mayor porcentaje de cepas resistentes a otros antibióticos. Se detectaron nueve patrones fenotípicos distintos de resistencia.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae* – Serogrupos – Resistencia – Antibióticos

In vitro susceptibility to antibiotics and the most common *Streptococcus pneumoniae* serotypes: A multicenter study

SUMMARY

The susceptibility and serotypes of 211 strains of *Streptococcus pneumoniae* collected from 12 Spanish hospitals in December 2003 were studied. Susceptibility tests for eight antibiotics were carried out by E-test®, and the serotype classification was carried out using pneumococcus antiserum from the Copenhagen Statens Serum Institute. Overall, the most frequent serotypes were 19 (12.2%); 6 (10.7%); 23 (10.2%); 3 (8.1%); 9 (6.6%); 14 (6.1%); and 29 (5.1%). In blood, the most frequent were 19 (16.6%) and 14 (11.9%), and 8.6% were nontypable. Under NCCLS (M7-A5) criteria, 55.6% of the strains were susceptible to penicillin (MIC ≤ 0.06 mg/l) and 7.9% showed high resistance (MIC ≥ 2 mg/l). Susceptibility to other antibiotics was 98% to moxifloxacin; 97.1% to levofloxacin; 94.6% to amoxicillin-clavulanic acid; 71.2% to cefuroxime; 84.4% to ceftriaxone; and 63.1% to clarithromycin and azithromycin. Only 13.3% of the strains showed susceptibility to the antibiotics tested. The greatest percentage of strains resistant to other antibiotics was found among the strains resistant to penicillin. Nine resistant phenotypes were detected.

Key words: *Streptococcus pneumoniae* – Serogroups – Resistance – Antibiotics

*E. Bouza (Hospital Gregorio Marañón, Madrid), M. Casal (Hospital Reina Sofía, Córdoba), R. Cisterna (Hospital Civil de Basurto, Bilbao), J. García de Lomas (Hospital Clínico, Valencia), J.A. García Rodríguez (Hospital Clínico, Salamanca), A.M. Martín (Hospital Insular, Las Palmas), E. Perea (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla), J.J. Picazo (Hospital Clínico San Carlos, Madrid), C. Rubio (Hospital Clínico, Zaragoza), M. Segovia (Hospital Morales Meseguer, Murcia) y G. Prats (Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona).

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es una bacteria patógena involucrada en enfermedades graves, como meningitis, neumonía, bacteriemia y peritonitis, y otras menos graves como sinusitis, otitis y artritis, con amplia difusión entre determinados sectores de la población, una incidencia de 6,4 a 10,5/100.000 personas-año, y de más trascendencia en los niños y en los inmunodeprimidos (1-11).

La sensibilidad de *S. pneumoniae* a los antibióticos ha ido cambiando a lo largo del tiempo, con variabilidad entre unos países y otros, e incluso entre diferentes zonas geográficas dentro de ellos. En España, desde mediados de los años 1980, el número de aislamientos con sensibilidad disminuida a la penicilina o resistencia a los macrólidos ha ido aumentando hasta llegar a cifras del 50% en algunas zonas (1, 12-24), a la vez que han aparecido cepas multirresistentes, todo relacionado con el consumo de antibióticos (25-27).

El tratamiento de las infecciones humanas es empírico la mayoría de las veces, basado en datos clínicos, epidemiológicos y en la experiencia que el médico tenga; por lo tanto, desde el punto de vista del tratamiento y de la posibilidad de actuar preventivamente frente a las infecciones neumocócicas mediante programas de vacunación, resulta necesario actualizar la sensibilidad de *S. pneumoniae* a diferentes antibióticos y determinar la prevalencia de los diversos serotipos en las distintas áreas.

El presente trabajo tiene como objetivo aportar datos recientes acerca de la sensibilidad y los serotipos prevalentes de *S. pneumoniae*. Durante el mes de diciembre de 2003 se recogieron las cepas de *S. pneumoniae* aisladas de pacientes con infección respiratoria, bacteriemia y otros procesos infecciosos, procedentes de varios hospitales (máximo 20 cepas por hospital), y se remitieron a un centro coordinador para su posterior estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recibieron 211 cepas de *S. pneumoniae* procedentes de 12 centros hospitalarios repartidos por la geografía nacional (Tabla 1). Estos centros, desde sus Servicios de Microbiología, enviaron las cepas aisladas por transporte especial urgente al Hospital La Fe de Valencia, encargado de comprobar los resultados de las pruebas de sensibilidad y realizar la serotipificación.

Identificación de las cepas

Los aislamientos bacterianos, a su llegada al centro de referencia, se sembraron en agar Mueller-Hinton suple-

Tabla 1. Hospitales participantes y número de cepas procesadas.

Centro hospitalario	Nº cepas
Hospital Clínico San Carlos (Madrid)	20
Hospital Universitario Insular (Las Palmas)	19
Hospital Morales Meseguer (Murcia)	15
Hospital Universitario La Fe (Valencia)	20
Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla)	17
Hospital Clínico Universitario (Zaragoza)	18
Hospital Gregorio Marañón (Madrid)	18
Hospital Clínico (Salamanca)	16
Hospital Civil de Basurto (Bilbao)	19
Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)	18
Hospital Clínico (Valencia)	17
Hospital Reina Sofía (Córdoba)	14
Total	211

Tabla 2. Distribución de las cepas de *S. pneumoniae* según el tipo de muestra.

Muestra	Porcentaje cepas
Aspirado traqueobronquial	20,4
Espito	38,9
Exudado	9,0
Líquido pleural	1,9
Sangre	20,4
Desconocida	9,5

mentado con un 5% de sangre de carnero (AS) y se incubaron durante 24 horas a 35-36 °C en atmósfera con un 5% de CO₂ para comprobar su pureza e identidad, lo que se confirmó mediante la prueba de sensibilidad a la optoquina (halo de inhibición >20 mm), α -hemólisis y solubilidad de las sales biliares. Posteriormente, las cepas identificadas se suspendieron en un medio de leche descremada (*Skim Milk*, Difco) y se guardaron congeladas a -80 °C para su conservación y estudios adicionales. De cada paciente se obtuvieron los datos referentes al origen de la muestra.

Serotipificación

La serotipificación se realizó mediante la prueba de la cápsula de Neufeld. Como es conocido, se trata de una re-

acción de precipitación entre el polisacárido capsular y el anticuerpo homólogo, que confiere propiedades refractivas a la cápsula del neumococo que, vista al microscopio, aparece hinchada y refringente. Los sueros antineumocócicos se obtuvieron del *Statens Serum Institute* (Copenhague, Dinamarca), cuyo lote consta de *omniserum* (mezcla de todos los serotipos de neumococos), nueve sueros polivalentes (A-I), que reaccionan con 8-14 serotipos, y 25 serotipos y 21 serogrupos. La reacción con el *omniserum* constituyó una prueba adicional de identificación. Los aislamientos correctamente identificados que no reaccionaron con el *omniserum* ni con ninguno de los nueve sueros polivalentes (A-I) se consideraron neumococos no tipificables. Antes de etiquetarlos como no tipificables se sembraron nuevamente y se repitió todo el proceso hasta tres veces.

Pruebas de sensibilidad

Las concentraciones mínimas inhibitoras (CMI) de penicilina (0,002-32 mg/l), amoxicilina-ácido clavulánico (0,016-256 mg/l), cefuroxima (0,016-256 mg/l), ceftriaxona (0,016-256 mg/l), azitromicina (0,016-256 mg/l), clindamicina (0,016-256 mg/l), levofloxacino (0,016-256 mg/l) y moxifloxacino (0,016-256 mg/l) se calcularon por *E-test*[®] (AB Biodisk, Solna, Suecia), siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir de un cultivo puro de 24 horas en AS se preparó una suspensión en tampón fosfato pH 7,3 que se ajustó a una densidad óptica (530 nm) correspondiente a 0,5 (1 para los mucosos) de la escala de McFarland. Se utilizaron tres placas de AS de 15 cm de diámetro por cepa. Las placas se sembraron homogéneamente con 100 µl de la suspensión y se dejaron secar durante 15 minutos antes de aplicar las tiras de *E-test*[®]. La lectura se realizó después de

Tabla 3. Distribución de los serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* por tipo de muestra.

Serogrupo/ serotipo	Nº de cepas						Total
	Aspirado traqueobronquial	Muestra desconocida	Espito	Exudado	Líquido pleural	Sangre	
1			1	1			2
3	2		10		1	3	16
4		2	1			1	4
6	3	2	8	6		2	21
7			1	1		2	4
8			3			2	5
9	5	2	2	1		3	13
10		2	1	1		1	5
11	1		3			1	5
14	1	1	2	1	2	5	12
15	1		4		1	2	8
16		1					1
17	1		1			1	3
18	1		1			2	4
19	5	2	7	3		7	24
20						1	1
21			2	1			3
22		1	1			3	5
23	3	3	12			2	20
24				1		1	2
29*	7		3				10
31	1		2				3
33		1	1				2
34	2			1			3
35	1		2			1	4
No tipificables	6		8	1		2	17
No serotipados	3	3	6	1	0	1	17
Total	43	20	82	19	4	43	197

*Los serotipos 29, 35 y 42 suelen tener reacción cruzada, y cuando esto ocurrió se consideraron serotipo 29 al reaccionar con diluciones más altas del antisuero.

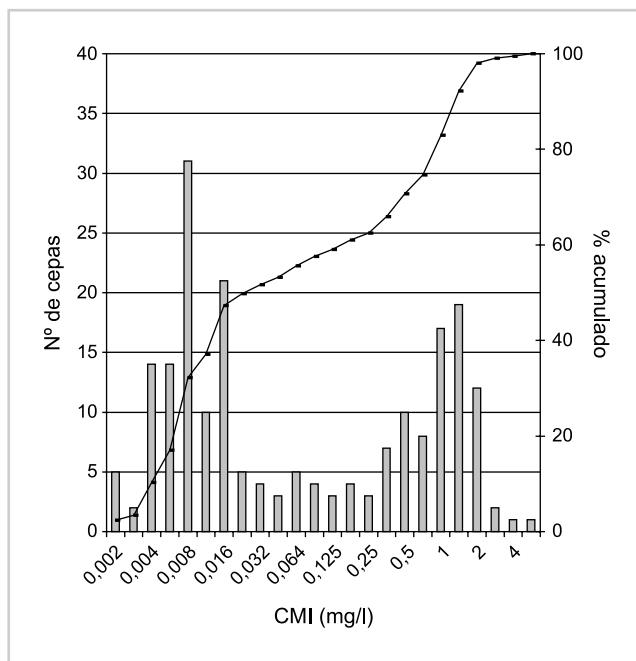


Figura 1. Distribución y porcentaje acumulado de las CMI de penicilina.

24 horas de incubación a 35-36 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Como cepas control de calidad se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Los puntos de corte utilizados para considerar las cepas sensibles, intermedias o resistentes a los diversos antibióti-

cos se basaron en los recomendados por el NCCLS en el documento M7-A5 (28). Para moxifloxacino se consideraron sensibles las cepas con una CMI ≤ 1 mg/l y resistentes si la CMI era ≥ 4 mg/l.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de los serotipos

De las 211 cepas recibidas, en 20 se desconocía la procedencia de la muestra. De las conocidas, la mayor parte eran invasoras, el 79,7% procedían del aparato respiratorio y un 20,4% de bacteriemias. En esputo se aisló el 38,9% de las cepas, en sangre el 38,9%, en aspirado traqueobronquial el 20,4% y en líquido pleural el 1,9% (Tabla 2).

En la Tabla 3 se muestra la distribución de los serotipos de las diferentes muestras evaluadas. De las 211 cepas, 14 (8,6%) no reaccionaron ante ningún suero antineumocócico y se etiquetaron como no tipificables. En total se identificaron 25 serotipos/serogrupos. Siete serotipos/serogrupos se aislaron con una frecuencia $>5\%$, lo que representan el 63,1% de los aislamientos. Los serotipos más frecuentes (porcentaje $>5\%$) fueron, por orden de frecuencia, el 19 (12,2%), el 6 (10,7%), el 23 (10,2%), el 3 (8,1%), el 9 (6,6%), el 14 (6,1%) y el 29 (5,1%). En sangre el más frecuente fue el 19 (16,6%), seguido del 14 (11,9%), mientras que en esputo los más frecuentes fueron los serotipos 23 (15,79%) y 3 (13,15%).

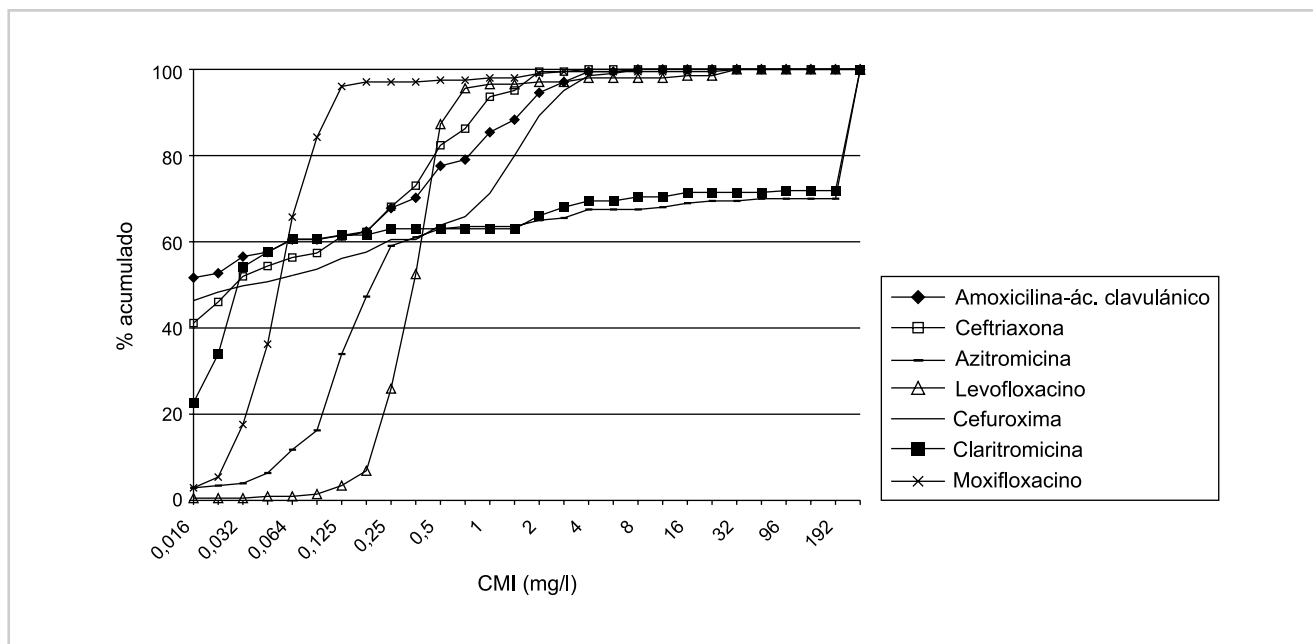


Figura 2. Porcentaje acumulado de las CMI de los antibióticos probados, excepto penicilina.

Tabla 4. Actividad de los antibióticos sobre *S. pneumoniae* dependiendo de su sensibilidad a la penicilina.

	Sensibles a la penicilina			No sensibles a la penicilina		
	% sensibles	% intermedias	% resistentes	% sensibles	% intermedias	% resistentes
Amoxicilina-ác. clavulánico	100,0	0,0	0,0	87,9	11,0	1,1
Cefuroxima	99,1	0,0	0,0	36,3	52,7	11,0
Ceftriaxona	100,0	0,9	0,0	59,3	28,6	11,0
Moxifloxacino	99,1	0,9	0,0	95,6	2,2	2,2
Levofloxacino	98,2	1,8	1,8	95,6	2,2	2,2
Claritromicina	77,0	0,0	23,0	45,6	0,0	54,4
Azitromicina	77,0	0,0	23,0	45,6	1,1	53,3

Puntos de corte del NCCLS en su documento M7-A5, en mg/l: penicilina S $\leq 0,064$, I = 0,12-1, R ≥ 2 ; amoxicilina-ácido clavulánico S ≤ 2 , I = 4, R ≥ 8 ; cefuroxima S ≤ 1 , I = 2, R ≥ 4 ; ceftriaxona S $\leq 0,5$, I = 1, R ≥ 2 ; moxifloxacino S ≤ 1 , I = 1,5-3, R ≥ 4 ; levofloxacino S ≤ 2 , I = 4, R ≥ 8 ; claritromicina S $\leq 0,25$, I = 0,5, R ≥ 1 ; azitromicina S $\leq 0,5$, I = 1, R ≥ 2 .

Según datos nuestros anteriores (1, 29), en 1979-1980 los serotipos más frecuentes fueron el 6, el 14, el 23 y el 3, y en los años 1999-2000 cambiaron, considerados en conjunto, al 19, el 6, el 23, el 14, el 3 y el 9; siendo los más frecuentes en las muestras de origen respiratorio el 6, el 14, el 19 y el 23, y en sangre el 14 y el 19.

También en estudios previos (24, 30) vimos que en la población mayor de 65 años los más frecuentes fueron el 3, el 6, el 19, el 23, el 9 y el 29, y en los niños el 19, el 6, el 23, el 14, el 3, el 9 y el 11.

Con la utilización de las nuevas vacunas antineumocócicas (conjugada heptavalente en niños menores de dos años y polisacáridica 23-valente en adultos) algunos autores han observado, junto con su eficacia, cambios en los serotipos aislados o reemplazo de serotipos no incluidos en la vacuna después de implantarla, aunque otros no (29, 31-36).

Sensibilidad a los antibióticos

En la Fig. 1 se representa la distribución de la CMI de penicilina y su porcentaje acumulado; en la Fig. 2 el porcentaje acumulado de la CMI de todos los antibióticos ensayados; en la Fig. 3 los porcentajes de cepas sensibles, intermedias y resistentes a estos mismos antibióticos. El 55,6% de las cepas fueron sensibles a la penicilina (CMI $\leq 0,06$ mg/l) y el 7,9% tuvieron resistencia elevada (CMI ≥ 2 mg/l). El 94,6% fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, el 71,2% a la cefuroxima y el 84,4% a la ceftriaxona. A los macrólidos claritromicina y azitromicina fueron sensibles el 63,1% de las cepas (CMI ≤ 1 mg/l y CMI ≤ 2 mg/l, respectivamente), teniendo el mayor porcentaje de cepas resistentes (36,9%) de todos los antibióticos probados.

Estos datos son semejantes a los informados en estudios de vigilancia realizados con cepas españolas de los años 1999 y 2000 (22, 37).

Se ha planteado entre nosotros la influencia de las cepas con sensibilidad intermedia a la penicilina en la evolución de la infección respiratoria. En concreto, en la neumonía, la mortalidad a los siete días fue similar, independientemente de si *S. pneumoniae* era sensible o intermedio al antibiótico (38).

Frente a las fluoroquinolonas, *S. pneumoniae* se comportó con porcentajes de sensibilidad similares: el 98% de las cepas fueron sensibles a moxifloxacino y el 97,1% a levofloxacino, pero la actividad intrínseca de moxifloxacino

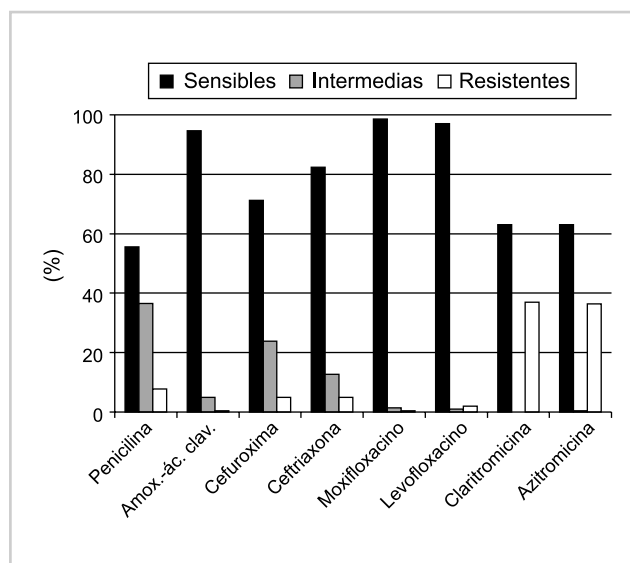


Figura 3. Sensibilidad de *S. pneumoniae* a los ocho antibióticos probados.

Tabla 5. Porcentaje de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a otros antibióticos según su sensibilidad a la penicilina.

Nº antibióticos con sensibilidad reducida	Nº (%) de cepas con CMI de penicilina		
	≤0,064	0,12-1	≥2
0	28 (24,6%)	20 (26,7%)	6 (37,5%)
1	47 (41,2%)	29 (38,7%)	3 (18,8%)
2	23 (20,2%)	18 (24,0%)	6 (37,5%)
3	14 (12,3%)	5 (6,7%)	1 (6,3%)
4	1 (0,9%)	3 (4,0%)	0 (0,0%)
5	1 (0,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total	114	75	16

Tabla 6. Fenotipos y serotipos de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina (CMI ≥ 2 mg/l).

Fenotipo	Nº cepas	Serotipo (nº)
R sólo a penicilina	6	NT (2), 21 (1), NS (1), 9 (1), 23 (1)
PV ^{NS} AZT ^{NS}	1	6 (1)
PV ^{NS} CLA ^{NS}	1	9 (1)
PV ^{NS} XM ^{NS}	1	19 (1)
PV ^{NS} CLA ^{NS} AZT ^{NS}	2	14 (2)
PV ^{NS} XM ^{NS} AZT ^{NS}	1	19 (1)
PV ^{NS} XM ^{NS} CLA ^{NS}	2	14 (1), NS (1)
PV ^{NS} XM ^{NS} LE ^{NS}	1	14 (1)
PV ^{NS} XM ^{NS} CTX ^{NS} AZT ^{NS}	1	NT (1)

PV: penicilina; CTX: ceftriaxona; AZT: azitromicina; LE: levofloxacino; XM: cefuroxima; CLA: claritromicina; NS: no serotipificado; NT: no tipificado.

fue superior, con CMI₉₀ = 0,25 mg/l versus 1 mg/l. Cuatro cepas fueron sensibles al moxifloxacino y resistentes al levofloxacino (dos de aspirados traqueobronquiales, una de esputo, una de origen desconocido), pero hubo una cepa (de origen desconocido) que fue resistente al moxifloxacino y sensible al levofloxacino.

Últimamente la literatura científica está aportando datos sobre el aumento de la resistencia a los macrólidos y de fracasos clínicos, y en menor grado, sin ser preocupante por ahora, al levofloxacino, hecho posiblemente derivado del empleo de dosis o intervalos inadecuados cuando esta quinolona se administra por vía oral (39-45).

En la Tabla 4 se presentan la sensibilidad a los antibióticos de las cepas sensibles y no sensibles a la penicilina, y en la Tabla 5 se indica el porcentaje de cepas que fueron re-

sistentes a más antibióticos dependiendo de su sensibilidad a la penicilina. Entre las cepas no sensibles a la penicilina se observó el mayor porcentaje de cepas resistentes a otros antibióticos.

Pocas cepas fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados, sólo 28 (15 de esputo, siete de aspirados traqueo-bronquiales, dos de exudados nasales, una conjuntival, una ótica y una de exudado de herida), destacando que de las 43 aisladas en sangre ninguna lo fue.

De las cepas aisladas en hemocultivo, sólo la mitad (22 cepas) fueron sensibles a la penicilina, 38 fueron resistentes a la azitromicina y únicamente cinco (11,6%) se mostraron sensibles a ambos antibióticos.

Las 16 cepas con CMI de penicilina ≥2 mg/l procedían de diversas muestras: ocho esputos, dos aspirados traqueo-bronquiales, tres hemocultivos, un exudado nasal y dos de origen desconocido. Los fenotipos y serotipos de estas cepas se muestran en la Tabla 6.

En resumen, consideramos que los datos aportados son una parte más de la amplia información que existe en España sobre *S. pneumoniae*, su sensibilidad a los antibióticos y su distribución por serotipos.

Correspondencia: Dra. Emilia Cantón, Bacteriología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar nº 21, 46009 Valencia. e-mail: canton_emi@gva.es

BIBLIOGRAFÍA

- Gobernado, M., Igual, R., Marco, V. y cols. *Infecciones neumocócicas. Epidemiología, serogrupos y resistencias*. Med Clin 1983; 80 (Suppl. 1): 54-59.
- Wenger, J.D., Hightower, A.W., Facklam, R.R., Gaventa, S., Broome, C.V., the Bacterial Meningitis Study Group. *Bacterial meningitis in the United States, 1986: Report of multistate surveillance study*. J Infect Dis 1990; 162: 1316-1323.
- MacFarlane J. *The clinical impact of pneumococcal disease*. En: Mayon-White, R. (Ed.). The clinical impact of pneumococcal disease and strategies for its prevention. International Congress and Symposium Series, nº 210, Royal Society of Medicine Press 1995; 9-16.
- Romero, J., Rubio, M., Corral, O., Pacheco, S., Aguado, E., Picazo, J. *Estudio de las infecciones respiratorias extahospitalarias*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1997; 15: 289-298.
- Muñoz, A., Sobrino, L., Velasco, M.L., Cano, R., Mateo, S. *Vigilancia de las neumonías en España*. Bol Epidemiol Sem 1997; 4: 29-36.
- Henrichsen, J. *Epidemiologie des infections pneumococciques en Europe*. Presse Med 1998; 27 (Suppl. 1): 5-8.
- Chow, A.W. *Acute sinusitis: Current status of etiologies, diagnosis, and treatment*. En: Remington, J.S., Swartz, M.N. (Eds.). Current Clinical Topics in Infectious Diseases. Blackwell Science, Malden, MA 2001; 31-63.

8. Monge, V., San Martín, M., González, A. *The burden of community-acquired pneumonia in Spain*. Eur J Public Health 2001; 11: 362-364.
9. Brook, I. *Bacteriology of acute and chronic frontal sinusitis*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2002; 128: 583-585.
10. Sáez-Llorens, X. *Impacto de la infección neumocócica invasora en niños*. An Esp Pediatr 2002; 57: 391-393.
11. Fernández Guerrero, M.L., Ramos, J.M., Marrero, J., Cuenca, M., Fernández Roblas, R., de Górgolas, M. *Bacteremic pneumococcal infections in immunocompromised patients without AIDS: The impact of beta-lactam resistance on mortality*. Int J Infect Dis 2003; 7: 46-52.
12. Hassman, D., Bullen, M.M. *A resistant pneumococcus*. Lancet 1967; 277: 264-265.
13. Liñares, J., Garau, J., Domínguez, C., Pérez, J.L. *Antibiotic resistance and serotypes of Streptococcus pneumoniae from patients with community acquired pneumococcal disease*. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 545-547.
14. Appelbasum, P.C. *World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci*. Eur J Clin Microbiol 1987; 3: 367-377.
15. Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D. y cols. *Evolution of Streptococcus pneumoniae serotypes and antibiotic resistance in Spain: Update (1990-1996)*. J Clin Microbiol 1998; 36: 3447-3454.
16. Navarro, C., Egido, P., Aspiroz, C. y cols. *Resistencia a penicilina y otros antimicrobianos en 301 aislamientos clínicos de Streptococcus pneumoniae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000; 18: 314-318.
17. Oteo, J., Alós, J.I., Gómez Garcés, J.L. *Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: A multicentre surveillance study*. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 215-218.
18. Cantón, R., Loza, E., Morosini, M.I., Baquero, F. *Antimicrobial resistance amongst isolates of Streptococcus pyogenes and Staphylococcus aureus in the PROTEKT antimicrobial surveillance programme during 1999-2000*. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl. 1): 9-24.
19. Appelbaum, P.C. *Resistance among Streptococcus pneumoniae: Implications for drug selection*. Clin Infect Dis 2002; 34: 1613-1620.
20. Fenoll, A., Asensio, G., Jado, I. y cols. *Antimicrobial susceptibility and pneumococcal serotypes*. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl. S2): 13-19.
21. García de Lomas, J., García Rey, C., López, L., Gimeno, C., Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Susceptibility patterns of bacteria causing community-acquired respiratory infections in Spain: The Sauce project*. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl. S2): 21-26.
22. Oteo, J., Cruchaga, S., Campos, J., Sáez-Nieto, J., Baquero, F. *Resistencia a antibióticos en 622 Streptococcus pneumoniae aislados de líquido cefalorraquídeo y sangre en 33 hospitales españoles de la Red de Vigilancia de Resistencia a Antibióticos (2000)*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21: 12-19.
23. García Rey, C., Bouza, E., Aguilar, L., García de Lomas, J., Baquero, F. *Evolution of penicillin and erythromycin co-resistance in Streptococcus pneumoniae in Spain*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 541-544.
24. Cantón, E., Montaner, M., Perez-Bellés, C. y cols. *Serotipos y sensibilidad antibiótica de Streptococcus pneumoniae en niños del área de Valencia y Castellón*. Rev Esp Quimioterap 2003; 16: 412-420.
25. Albrich, W.C., Monnet, D.L., Harbarth, S. *Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes*. Emerg Infect Dis 2004; 10: 514-517.
26. Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., García-Rey, C., Dal-Re, R., Baquero, F. *Streptococcus pneumoniae resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 767-773.
27. Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M., Iglesias, L., Larruskain, J. *Fluoroquinolone and macrolide treatment failure in pneumococcal pneumonia and selection of multidrug-resistant isolates*. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1159-1162.
28. NCCLS. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*, 5th ed. Approved standard M7-A5. NCCLS, Wayne, PA 2000.
29. Montaner, M. *Determinación de serotipos y patrones de resistencia de Streptococcus pneumoniae en la Comunidad Valenciana*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia 2001.
30. Montaner, M., Cantón, E., Diosdado, N. y cols. *Cobertura de la vacuna antineumocócica 23-valente en los mayores de 64 años en el área de Castellón y Valencia*. Rev Esp Quimioterap 2004; 17: 155-160.
31. Whitney, C.G. *The potential of pneumococcal conjugate vaccines for children*. Pediatr Infect Dis J 2002; 21: 961-970.
32. Fedson, D.S., Musher, D.M. *Pneumococcal vaccine*. En: Plotkin S.A., Mortimer E.A. (Eds.). Vaccines. W.B. Saunders, Philadelphia 1994; 517-564.
33. Artz, A.S., Ershler, W.B., Longo, D.L. *Pneumococcal vaccination and revaccination of older adults*. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 308-318.
34. Ling, P., Michaels, M.G., Janosky, J., Ortenzo, M., Wald, E.R. *Incidence of invasive pneumococcal disease in children 3 to 36 month of age at a tertiary care pediatrics center 2 years after licensure of pneumococcal conjugate vaccine*. Pediatrics 2003; 111: 896-899.
35. Black, S., Shinefield, H., Fireman, B. y cols. *Efficacy, safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children*. Pediatr Infect Dis 2002; 19: 187-195.
36. Montamarta, C., Climent, J.L., Milian, C., Ordas, E., Escrig, J. *Vacunación antineumocócica: Bienio 2001-2 y estudio médico-legal en Alaccer (Valencia)*. 2º Congreso Nacional de la Asociación Española de Vacunología, Las Palmas de Gran Canaria 2003.
37. Oteo, J., Alós, J.I., Gómez Garcés, J.L. *Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: A multicentre surveillance study*. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 215-218.
38. Falco, V., Almirante, B., Jordano, Q. y cols. *Influence of penicillin resistance on outcome in adult patients with invasive pneumococcal pneumonia: Is penicillin useful against intermediately resistant strains?* J Antimicrob Chemother 2004; 54: 1-8.
39. Kelley, M.A., Weber, D.J., Gilligan, P. y cols. *Breakthrough pneumococcal bacteremia in patients being treated with azithromycin and clarithromycin*. Clin Infect Dis 2000; 31: 1008-1011.
40. Fogarty, C., Goldschmidt, R., Bush, K. *Bacteremic pneumonia due to multidrug-resistant pneumococci in 3 patients treated unsuccessfully with azithromycin and successfully with levofloxacin*. Clin Infect Dis 2000; 31: 613-615.
41. Urban, C., Rahman, N., Zhao, X. y cols. *Fluoroquinolone-resistant Streptococcus pneumoniae associated with levofloxacin therapy*. J Infect Dis 2001; 184: 794-798.
42. Davidson, R., Cavalcanti, R., Brunton, J.L. y cols. *Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia*. N Engl J Med 2002; 346: 747-750.
43. Kays, M.B., Smith, D.W., Wack, M.F., Denys, G.A. *Levofloxacin treatment failure in a patient with fluoroquinolone-resistant Streptococcus pneumoniae pneumonia*. Pharmacotherapy 2002; 22: 395-399.
44. Ross, J.J., Worthington, M.G., Gorbach, S. *Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia*. N Engl J Med 2002; 347: 65-67.
45. Anderson, K.B., Tan, J.S., File, T.M. Jr., DiPersio, J.R., Willey, B.M., Low, D.E. *Emergence of levofloxacin-resistant pneumococci in immunocompromised adults after therapy for community-acquired pneumonia*. Clin Infect Dis 2003; 37: 376-381.