

Epidemiología y Caracterización Fenotípica y Serológica de *Streptococcus Pneumoniae* resistentes a la Penicilina provenientes de portadores nasales

Beatriz Quintero^{1,2}, María Araque², Ezio Valeri³ y Lourdes Quintero³

Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica, Facultad de Medicina¹, Universidad de Los Andes. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes². Servicio de Emergencia Pediátrica, Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela³.

RESUMEN

Las infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* son una de las principales causas de enfermedad respiratoria en niños menores de 5 años. El transporte nasofaríngeo de *S. pneumoniae* ha sido correlacionado con la aparición de la enfermedad clínica. De manera que, las características que presentan estos aislados en su condición de transporte en el huésped humano podría servir como indicador de la prevalencia de estas cepas en una población específica. Un total de 125 niños fueron incluidos en este estudio, de los cuales 30 (24%) resultaron positivos al aislamiento de *S. pneumoniae* en secreción nasal. La frecuencia de aislamiento se relacionó con la presencia de infección respiratoria recurrente (41%, $p=0.009$). Inicialmente las cepas fueron identificadas de acuerdo a la apariencia colonial, la producción de α -hemólisis y la tinción al Gram. La identificación definitiva se realizó mediante la sensibilidad a la optoquina, la solubilidad en bilis y la aglutinación en látex. Sin embargo, la serotipificación sólo fue posible en el 90% de las cepas, siendo los serotipos 6B, 23F y 14 los más frecuentes. El 47% de las cepas aisladas presentaron resistencia a la penicilina (CIM $>0,12 \mu\text{g/ml}$) y un 3% de estas cepas mostraron altos niveles de resistencia a la penicilina ($> 2 \mu\text{g/ml}$). Los serotipos 6B y 23F fueron los que comúnmente se asociaron con este marcador. Ninguna de las cepas resistentes a la penicilina se les detectó la producción de β -lactamasa. Este estudio demostró que el tratamiento previo con antibióticos constituyó el principal factor de riesgo relacionado con la prevalencia de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina en la población infantil estudiada (64%, $p < 0.05$). Los resultados obtenidos permitirán orientar la terapia empírica de patologías producidas por *S. pneumoniae*, así como la aplicación de un programa de vacunación adaptado a los serotipos más frecuentemente encontrados en la población infantil.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae infections are a leading cause of respiratory illness in young children. The nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae* has been correlated to the emergence of clinical disease. Thus, the characteristics of carriage isolates could serve as indicators of the prevalence of these strains in a specific population. A total of 125 children were included in this study; 30 (24%) patients' nasopharyngeal swab cultures were positive for *S. pneumoniae*. The isolation frequency of these strains has been related to recurrent pulmonary infections (41%, $p=0.009$). All the strains were initially identified using typical colonial appearance, α -hemolysis and Gram staining. Definitive identification was carried out by means of optochin sensitivity, bile solubility and latex agglutination test. However, serotyping was possible on 90% of the isolated strains. The most prevalent serotypes of *S. pneumoniae* encountered were 23F, 6B and 14. Fourteen (47%) of the strains isolated were consistently resistant to penicillin (MIC $>12 \mu\text{g/ml}$) and the serotypes 6B and 23F were commonly associated with this marker. Production of β -lactamase in the strains resistant to penicillin was not detected. This study shows that previous antibiotic treatments were important factors of risk related to the prevalence of nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae* resistant to penicillin in children younger than 5 years from an urban area (64%, $p < 0.05$). The results obtained will allow to orient the empiric therapy for the pathology caused by *S. pneumoniae*, as well as the application of an appropriate vaccination program specially adapted to the serotypes more frequently found in children.

PALABRAS CLAVES

Streptococcus pneumoniae, serotipos, portador nasal, resistencia a la penicilina.

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 el Consejo de Estudios de Postgrado y por el proyecto FONACIT No. F-2000001633.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones agudas del tracto respiratorio producen anualmente 4 millones de muertes infantiles en los países en desarrollo. El 70% de las muertes relacionadas con infecciones agudas del tracto respiratorio son debidas a neumonías, de las cuales *Streptococcus pneumoniae* es la causa bacteriana más frecuente (Kertesz y col. 1998). La población pediátrica menor de 2 años constituye el grupo etario más susceptible de sufrir infecciones neumocócicas. Por otra parte, es importante resaltar que los niños menores de 5 años presentan la frecuencia más alta de colonización de neumococos resistentes a la penicilina (Soh y col. 2000). La evolución y la amplia distribución global de los determinantes de resistencia a los antibióticos en las bacterias han generado que los neumococos resistentes a la penicilina sea un hallazgo común, complicando de esta manera la conducta terapéutica de las infecciones producidas por este microorganismo (Doherty y col. 2000). Entre las intervenciones dirigidas a reducir la infección y la diseminación de neumococos resistentes, se encuentra el desarrollo de vacunas proteína-polisacárido conjugadas (Shrag y col. 2000). Sin embargo, el conocimiento de los patrones de susceptibilidad antibiótica y los serotipos circulantes de *S. pneumoniae* en la población infantil pueden contribuir en la planificación de futuros esquemas de tratamientos y en la aplicación de estrategias preventivas de la enfermedad (Song y col. 1999). En tal sentido, los registros de los perfiles de susceptibilidad de las cepas de *S. pneumoniae* ayudarán a comprender los mecanismos involucrados en la resistencia de estos microorganismos (Doren, 2001; Jones y col. 2003). Es por ello, que consideramos importante realizar un estudio para caracterizar desde el punto de vista fenotípico y serológico cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina aisladas de portadores nasales pediátricos provenientes de una comunidad urbana.

MATERIALES Y METODOS

Población y muestra: Se analizó microbiológicamente la secreción nasal de un total de 125 niños varones y hembras, con edades comprendidas entre 28 días a 5 años, que acudieron a la emergencia pediátrica del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, 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 y/o presentaran un trauma facial o alteración anatómica nasal que impidiera la recolección de la muestra, así como, 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.

Estudio Microbiológico

· **Colección de la muestra:** En cada fosa nasal se introdujo un hisopo de algodón estéril previamente humedecido en una solución fisiológica estéril y, mediante la extracción del mismo con movimientos rotatorios se recolectó una suficiente cantidad 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.

· **Examen directo:** A cada una de las muestras se les realizó un frotis teñido con Gram y otro con la coloración de Hansel, con la finalidad de valorar la flora microbiana y la presencia de células inflamatorias, y/o la presencia de eosinófilos en el moco nasal respectivamente.

· **Aislamiento e identificación de *Streptococcus pneumoniae*:** Inicialmente las muestras fueron 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 como sospechosa de neumococos. Estas colonias se seleccionaron y a partir de ellas, se realizaron subcultivos para posteriormente proseguir con su identificación preliminar, la cual se fundamentó en la susceptibilidad a la optoquina (BBL)(zona de inhibición alrededor del

disco de ≥ 14 mm) de acuerdo a lo descrito por Gardam y col., 1998. La biotipificación definitiva se realizó mediante la prueba de solubilidad en bilis según los criterios de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), 1998 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 of Copenhagen, Dinamarca, de acuerdo a lo descrito por la OPS (1998).

· **Detección de cepas resistentes a la penicilina:** Para la selección de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina, a todas las cepas aisladas inicialmente se les evaluó cualitativamente la susceptibilidad a la penicilina mediante la técnica de difusión del disco, y utilizando el disco de oxacilina de 1 μ g (BBL), de acuerdo a los criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. Posteriormente, las cepas que resultaron resistentes a la penicilina se les determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en caldo Mueller-Hinton No. 2 (HiMedia) suplementado con 5% de sangre de caballo lisada, según las recomendaciones de la NCCLS, 2002. La cepa control para estos ensayos fue *S. pneumoniae* CVC650.

· **Detección de β -lactamasas en cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina:** Utilizando la nitrocefina (Oxoid) como sustrato de las β -lactamasas y la técnica de detección colorimétrica descrita por O'Callagan y col. (1992), se determinó cualitativamente la presencia de β -lactamasas en las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina.

Análisis estadístico: Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el Statical Package for the Social Sciencies (SPSS) versión 7.5 y los resultados fueron analizados mediante la aplicación de la prueba de Chi Cuadrado.

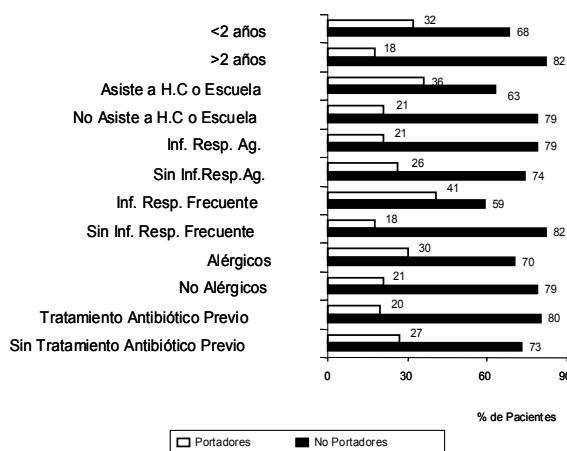
RESULTADOS

Características clínico-epidemiológicas de la población en estudio: Un total de 125 niños fueron seleccionados para el estudio. De estos la edad promedio fue de 26 meses, el 55% estuvo representado por el sexo masculino y el 42% se ubicó en el estrato socioeconómico tipo IV (clase obrera). El 38% de los niños asistía a hogares de cuidado diario o preescolares. Desde el punto de vista clínico, destaca que el 35% de los niños tenían 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 les realizó diagnóstico de infección respiratoria aguda en el momento del estudio, mientras que, el 32% presentaban infección respiratoria recurrente (datos no mostrados).

Factores clínico-epidemiológicos y frecuencia de colonización de *S. pneumoniae*: De los 125 niños seleccionados sólo 30 (24%) cepas de *S. pneumoniae* fueron aisladas. La frecuencia de recuperación de estas cepas estuvo asociada principalmente a la infección respiratoria recurrente (41%, $p=0.009$), siguiéndole en orden de frecuencia la asistencia a hogares de cuidado diario o preescolares (36%), edad menor de 2 años (32%) y los antecedentes de alergia (30%)

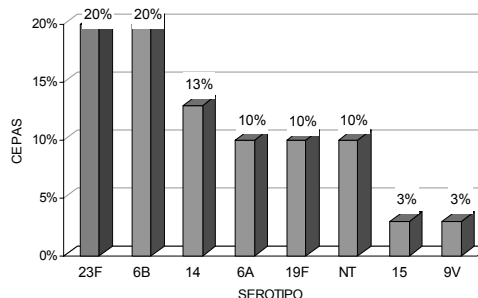
Gráfico N° 1 Relación Clínico-Epidemiológica y Colonización Nasal de *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 5 años.



H.C: Hogares de cuidado diario; Inf. Resp. Ag.: Infección respiratoria aguda.

Tipos serológicos de *S. pneumoniae* y su relación con la resistencia a la penicilina: Las 30 cepas de *S. pneumoniae* fueron identificadas a partir de las pruebas bioquímicas clásicas y serológicas. Sin embargo, sólo el 90% de estas cepas pudieron ser tipificadas, siendo los serotipos 23F, 6B y 14 los más frecuentes (53%)

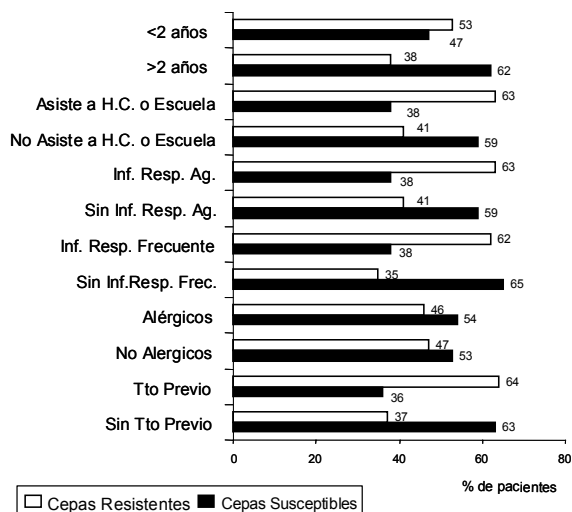
Gráfico N° 2 Distribución de los tipos Serológicos en las 30 Cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños menores de 5 años



El 47% de las cepas de *S. pneumoniae* presentaron resistencia a la penicilina con rangos inhibitorios > 0.12 $\mu\text{g/ml}$. Un 3% de estas cepas mostraron altos niveles de resistencia a la penicilina (> 2 $\mu\text{g/ml}$). Los serotipos asociados con la resistencia intermedia a la penicilina fueron: 6A, 6B, 23F, 14 y 15 y con alta resistencia a la penicilina fue el serotipo 6B. No se detectó producción de β -lactamasa en ninguna de las cepas aisladas (datos no mostrados).

Factores clínicos-epidemiológicos y su relación con *S. pneumoniae* resistente a la penicilina: El antecedente de tratamiento con antibióticos (64%; $p < 0.05$), la asistencia a hogares de cuidado diario o a preescolares (63%), la infección respiratoria aguda (63%) y el antecedente de infección respiratoria frecuente (62%) fueron los factores clínicos-epidemiológicos más comúnmente asociados con la recuperación de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina. Por el contrario, las cepas susceptibles a penicilina se recuperaron más en los niños con antecedentes de alergias (47%)

Gráfico N° 3 Relación Clínico-Epidemiológica y Colonización Nasal de *Streptococcus pneumoniae* sensibles o resistentes a la Penicilina en niños menores de 5 años



H.C.: Hogares de cuidado diario; Inf. Resp. Ag.: Infección respiratoria aguda; Inf. Resp. Frec.: infección respiratoria frecuente; Tto.: tratamiento.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la frecuencia de aislamiento de *S. pneumoniae* en portadores nasales es muy variable dependiendo de la región geográfica en la que se lleva a cabo el estudio (Schrag y col. 2000). Vives y col. (1997) en Costa Rica encontraron una frecuencia de colonización del 19,4% al final del primer año de vida y en Taiwan, la frecuencia de aislamientos de neumococos en menores de 7 años fue de un 21% (Chiou y col. 1998). En este estudio, el

porcentaje de aislamiento de *S. pneumoniae* fue mayor (24%) al observado en los trabajos mencionados, mientras que en Estados Unidos la frecuencia de colonización fue superior, variando entre un 47% en menores de 6 años (Arnold y col. 1996) y un 38% en niños preescolares (Rubín y col. 2000). En tal sentido, investigaciones realizadas por Raymond y col. (2000) y Varon y col. (2000) entre otros, han señalado que niños menores de 2 años que acuden a guarderías y/o han recibido tratamientos con antibióticos tienen una tasa de colonización menor. Sin embargo, resultados contradictorios fueron obtenidos en este estudio, debido a que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las variables señaladas anteriormente y la frecuencia de aislamiento de *S. pneumoniae*. Por el contrario, si se observó una asociación directa entre la infección respiratoria frecuente y la presencia de *S. pneumoniae* (41%, $p = 0.009$). Es por ello, que consideramos, que 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.

Las pruebas clásicas para la identificación de *S. pneumoniae* son la susceptibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis (Murray y col., 2003). Sin embargo, se han reportado cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina y no solubles en bilis (Borek y col. 1997). Todas las cepas de *S. pneumoniae* analizadas en este estudio fueron susceptibles a la optoquina, y no se encontró diferencias entre los resultados obtenidos con esta prueba y la de solubilidad en bilis, por lo que estas cepas fueron consideradas como bioquímicamente típicas. A pesar de que la identificación del neumococo puede ser confirmada con la prueba de aglutinación en látex, se ha reportado que hasta un 20 % de los aislados de neumococos provenientes de portadores pueden no ser detectados por esta prueba (Cima-Cabal y col. 1999). Todas las cepas aisladas en este estudio fueron positivas para la identificación con la prueba de aglutinación en látex. De acuerdo a la reacción de Quellung se observó que el 73% de las cepas de neumococos aisladas pertenecían a los serotipos 6B, 23F y 14. Varon y col. (2000) en Francia, reportaron resultados similares donde los serotipos 6B, 19F, 23F y 14 fueron los más comúnmente encontrados en portadores nasales. Sniadack y col. (1995), citado por Rubín y col. (2000), afirman 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.

La frecuencia de resistencia a la penicilina entre cepas de neumococos provenientes de portadores pediátricos varía de una región geográfica a otra. De

manera que, en Norte América el porcentaje de cepas de neumococos resistentes a la penicilina aislados en pacientes menores de 5 años es de un 31.8% (Jones y col., 2003), mientras que en Europa y en el continente asiático, la resistencia de neumococo a la penicilina oscila entre un 10.4 % a un 17.8% respectivamente (Hoban y col., 2001). De acuerdo a los resultados reportados por el grupo SENTRY, correspondientes al programa de 1997 a 1999, en Latinoamérica las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina se encuentran en el orden de un 11.7% (Jones y col., 2003). Sin embargo, sorprende el hecho que en este estudio, el porcentaje de resistencia a la penicilina en las cepas de neumococos aisladas fue de un 47%, hallazgo que superó lo reportado en otras investigaciones. Es probable, que esta alta resistencia detectada en las cepas analizadas este enmarcada principalmente en el uso indebido de la penicilina en infecciones respiratorias no bacterianas.

En ninguna de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina aisladas se detectó la producción de β -lactamasas, probablemente el mecanismo de resistencia en estos neumococos sea la presencia de proteínas fijadoras de la penicilina (PBP) con reducida afinidad a los β -lactámicos (Zhao y col. 2000). En este contexto, Rubín (2000) afirma que a nivel mundial los serotipos más frecuentemente asociados con resistencia a la penicilina son el 6, 9, 14, 19 y 23. Sin embargo, en este estudio se encontró que los serotipos de neumococos comúnmente asociados con resistencia a la penicilina fueron el 6B y 23F. Por otra parte, se observó que el antecedente de tratamiento previo con antibióticos constituyó el factor predisponente más significativo ($p < 0.05$), relacionado con el riesgo de portar *S. pneumoniae* resistente a la penicilina en la mucosa nasal.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el 24% de la población estudiada, especialmente los niños con antecedentes de infección respiratoria frecuente ($p = 0.009$), fueron portadores nasales de *S. pneumoniae* serotipos 6B, 23F y 14. El 47% de las cepas recuperadas presentaron resistencia a la penicilina siendo los serotipos 6B y 23F los que se asociaron con mayor frecuencia a este marcador. El factor más importante que determinó el riesgo de ser portador de neumococos resistentes a la penicilina fue el antecedente de haber recibido antibioticoterapia previa ($p < 0.05$).

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 la penicilina, en niños portadores nasales menores de 5 años provenientes de un área urbana.

Los resultados obtenidos permitirán a nivel local

orientar la terapéutica empírica de las infecciones producidas por los neumococos, así como, las estrategias a aplicar para una vacunación adaptada a los serotipos que con mayor frecuencia circulan en la población infantil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arnold, K., Leggiadro, R., Breiman, R., Lipman, H., Schwartz, B., Appeto, M., Cleveland, K., Szeto, H., Hil, B., Tenover, F., Elliot, J., Facklam, R. 1996. **Risks factors for carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Memphis, Tennessee.** J Pediatr. 128:757-64.

Borek, A., Dressel, D., Hussong, J., Peterson, L. 1997. **Evolving clinical problems with *Streptococcus pneumoniae*: Increasing resistance to antimicrobial agents, and failure of the traditional optochin identification in Chicago, Illinois, between 1993 and 1996.** Diagn Microbiol Infect Dis. 29:209-214.

Chiou, C., Liu, Y., Huang, T., Hwang, W., Wang, J., Lin, H., Yen, M., Hsieh, K. 1998. **Extremely high prevalence of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Kaohsiung, Taiwan.** J Clin Microbiol. 36(7):1933-1937.

Cima-Cabal, M., Vasquez, F., Mendez, F. 1999. **Rapid and reliable identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates by pneumolysin-mediated agglutination.** J Clin Microbiol; 37(6):1964-66.

Doern, G.V. 2001. **Antimicrobial use and emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States.** Clin Infect Dis. 33(sup3): S187-192.

Doherty, N., Trzcinski, K., Pickerill, P., Zawadzki, P., Dawson, C. 2000. **Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*.** Antimicrob Agents Chemother. 44(11):2979-2984.

Gardam, M., Miller, M. 1998. **Optochin revisited: Defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of *Streptococcus pneumoniae*.** J. Clin. Microbiol.; 36(3): 833-834.

Kertes, D., Di Fabio, J., Brandileone, M., The PAHO Pneumococcal Surveillance Study group. 1998. **Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: Results of the Pan American Health Organization surveillance study.** Clin Infect Dis. 26: 1355-61.

Hoban, D.J., Doern, G.V., Fluit, A.C., Roussel-Delvallez, M., Jones, R.N. 2001. **Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY antimicrobial**

surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis. 32 (Sup 2): S81-93.

Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Beach, M.L. 2003. **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. 46: 77-80.

Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (2003). **Manual of Clinical Microbiology.** Vol.1. 8^o ed. ASM press. Washington DC. P.405-421.

National Committee for Clinical laboratory Standards. (2002). **MIC testing. Supplemental tables M100-S12.** NCCLS: National Committee for Clinical laboratory Standards. Wayne, PA.

O'Callaghan, C., Morris, A., Kirby, S., Shingler, A. 1992. **Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate.** Antimicrob Agents Chemother. 1:283-288.

Raymond, J., Le Thomas, I., Moulin, F., Commeau, A., Gendrel, D., Berche, P. 2000. **Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in a orphanage.** J Infect Dis. 181:1983-8.

Organización Panamericana de la Salud. 1998. **Manual de *Streptococcus pneumoniae*.** Taller sobre la identificación bioquímica y serológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Santa Fe de Bogotá- Colombia. Pág: 19-23

Rubin, L. 2000. **Vaccine pneumococcal.** Pediatric Clin North Amer. 47(2):269-285.

Schrag, S., Beall, B., Dowell, S. 2000. **Limiting the spread of resistant pneumococci: Biological and epidemiological evidence for the effectiveness of alternative interventions.** Clin Microbiol Rev. 13(4):588-601.

Soh, S., Poh, C., Pin Lin, R. 1999. **Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from pediatric patients in Singapore.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(8): 2193-2196

Song, J., Lee, N., Ichiyama, S., Yoshida, R. 2000. **Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) study.** Clin Infect Dis. 28:1206-1211.

Varon, E., Levy, C., De La Rocque, F., Boucherat, M., Deforche, D., Podglajen, I., Navel, M., Cohen, R. 2000. **Impact of antimicrobial therapy on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Branhamella catarrhalis* in children with respiratory tract infections.** Clin Infect Dis. 31: 477-81.

Vives, M., García, M., Saenz, P. Mora, M., Mata, L., Sabharwal, H., Svanborg, C. 1997. **Nasopharyngeal colonization in Costa Rican children during the first year of life.** Pediatr Infect Dis. 16:852-8.

Zhao, G., Meier, T., Hoskins, J., McAllister, K. 2000. **Identification and characterization of the penicillin-binding-protein 2a of *Streptococcus pneumoniae* and this possible role in resistance to β -lactam antibiotics.** Antimicrob Agents Chemother. 44(6):1745-1748.