

Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina en portadores nasofaríngeos menores de 2 años.

OCHOA WOODSELL, Theresa Jean \*

SUMMARY

**Pneumococcus is an important etiologic agent of common diseases in all ages. In the recent decades pneumococcus strains resistant to penicillin began to appear worldwide. Locally the problem is not well known. Objective:** The purpose of this study was to determine the percentage of penicillin resistant pneumococcus among nasopharyngeal carrier-children less than 2 years of age in the pediatric outpatient clinic (Crecimiento y Desarrollo) at the Hospital Nacional Cayetano Heredia in Lima.

**Material and methods:** Nasopharyngeal cultures for *S. pneumoniae* were obtained from 170 children (September 1996-March 1997). The E-test was used to determine penicillin resistance and disk diffusion for other antibiotics. **Results:** In a group of children aged 6 months to 2 years 44% (75/170) were nasopharyngeal carriers of pneumococcus. The presence of three or more children in the family was associated with a higher percentage of carriers. Among 75 strains isolated, 4 (5.3%) were resistant to penicillin: of these, 3 strains (4%) were intermediately resistant and 1 (1.3%) was highly resistant (MIC=1.5µg/mL). Resistance to other antibiotics was: trimethoprim/sulfamethoxazole 39 strains (52%), cefaclor 18 (24%), chloramphenicol 17 (22.7%), erythromycin 14 (18.6%), clindamycin 9 (12%) and rifampin 8 (10.7%). **Conclusion:** The percentage of penicillin-resistant pneumococcus remains low at Cayetano Heredia Hospital. Nevertheless it is urgent to establish strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganism. (*Rev Med Hered* 1998; 9:56-62).

**KEY WORDS:** *Streptococcus pneumoniae*, resistance, penicillin, nasopharyngeal carriers, children.

RESUMEN

El neumococo es un agente etiológico importante de infecciones comunes que afectan a todas las edades. En las últimas décadas han aparecido a nivel mundial cepas de neumococo resistentes a la penicilina. A nivel local no se conoce la magnitud de este problema. **Objetivo:** El objetivo fue determinar el porcentaje de resistencia del neumococo a la penicilina en portadores nasofaríngeos menores de 2 años en el Consultorio de Crecimiento y Desarrollo del Hospital Nacional Cayetano Heredia en Lima. **Material y métodos:** Se tomaron muestras de hisopeado nasofaríngeo en 170 niños (Setiembre 1996-Marzo 1997), para cultivo de neumococo y determinación de su sensibilidad a la penicilina con el E-test y a otros antibióticos con la sensibilidad en disco. **Resultados:** Se encontró 44% (75/170) de portadores nasofaríngeos de neumococo en niños de 6 meses a 2 años. La presencia de tres o más niños en la familia estuvo asociado a un mayor porcentaje de portadores. De las 75 cepas aisladas, 4 (5.3%) fueron resistentes a la penicilina, incluyendo 3 (4%) con resistencia intermedia y 1 (1.3%) con alta resistencia (MIC=1.5µg/mL). La resistencia a otros antibióticos fue: trimethoprim/ sulfamethoxazole 39 cepas (52%), cefaclor 18 (24%), cloranfenicol 17 (22.7%), eritromicina 14 (18.6%), clindamicina 9 (12%) y rifampicina 8 (10.7%). **Conclusión:** La resistencia del neumococo a la penicilina continúa baja en el Hospital Cayetano Heredia; sin embargo, es urgente establecer estrategias de prevención y control de la emergencia y diseminación de microorganismos resistentes. (*Rev Med Hered* 1998; 9:56-62).

**PALABRAS CLAVE:** *Streptococcus pneumoniae*, resistencia, penicilina, portadores nasofaríngeos, niños.

\* Bachiller en Medicina. Bachiller en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Médico Residente de Pediatría. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Departamento de Pediatría, Hospital Nacional Cayetano Heredia.

## INTRODUCCIÓN

El neumococo es un agente etiológico importante de infecciones comunes que afectan a todas las edades, en particular a los niños y ancianos. Puede encontrarse colonizando la nasofaringe, donde se aísla en 5 a 10 % de adultos y 20 a 40 % de niños sanos (1).

En las últimas décadas han aparecido a nivel mundial cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina y a otros antibióticos. Algunos países como España, Rumania, Israel y África del Sur, presentan altos niveles de resistencia a la penicilina (25 a 50%) (2)(3). En los Estados Unidos la resistencia ha aumentado de 5% en 1979-1987 a 23.6% en 1994-1995 (4). En Sudamérica los niveles de resistencia varían desde un 4% en Uruguay, hasta un 21% en Chile y 24% en Argentina (5)(7).

A nivel nacional los trabajos previos son escasos. Fukuda en 1994 (8) encontró 3.3 % de resistencia en 61 cepas de neumococo en cuatro hospitales de Lima. Janof en 1993 (9) encontró 3 % de resistencia en 38 cepas en el Instituto Nacional del Niño. En el Hospital Nacional Cayetano Heredia, Adachi en 1991 (10) encontró 100 % de susceptibilidad en 19 cepas; sin embargo, en el mismo período, Villa (11) reportó 58 % de resistencia en 19 cepas. Estos trabajos difieren considerablemente en la metodología y resultados, por lo que no pueden dar certeza de la magnitud de este problema a nivel local.

Es importante conocer, en nuestro medio, el porcentaje de portadores nasofaríngeos de neumococo, dado que esto correlaciona con el nivel de enfermedad causada por estas cepas en una determinada comunidad (12).

Conocer los patrones locales de sensibilidad del neumococo es de suma importancia, porque si bien la penicilina sigue siendo altamente efectiva en el tratamiento de infecciones producidas por cepas medianamente resistentes a la penicilina, no se tiene seguridad de su uso en cepas altamente resistentes (13). Por otro lado, el desarrollo local de resistencia puede implicar cambios en el uso de antibióticos para el tratamiento empírico inicial de una infección severa, tal como la meningitis (14); por lo que es importante conocer el patrón de sensibilidad a otros antibióticos que puedan usarse como alternativa terapéutica.

El objetivo del presente estudio fue determinar la proporción de portadores nasofaríngeos de neumococo en niños menores de 2 años en el Consultorio Externo de Crecimiento y Desarrollo del Hospital Nacional Cayetano Heredia, y el porcentaje de resistencia de estas cepas de neumococo a la penicilina y otros antibióticos.

## MATERIAL Y METODOS

Se tomaron muestras de hisopeado nasofaríngeo para cultivo de *S. pneumoniae* en 170 niños durante un período de 6 meses (Setiembre de 1996 a Marzo de 1997) en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (HNCH) en Lima.

### *Criterios de inclusión:*

1. Niños de 6 a 24 meses, que acudieron a control médico de rutina en el Consultorio de Crecimiento y Desarrollo del HNCH.
2. Los niños podían presentar patología respiratoria leve, recibir antibióticos al momento o tener el antecedente de uso de antibióticos u hospitalizaciones anteriores.

### *Criterios de exclusión*

1. Niños con enfermedad grave que requería hospitalización o transferencia a Emergencia.
2. Niños transferidos de Emergencia o de otro Consultorio de Pediatría.

### *Análisis de laboratorio*

Se tomó una muestra de secreción nasofaríngea por paciente, utilizando un hisopo estéril de alginato de calcio, el que se colocó en un tubo con TSB (Caldo de Tripticasa Soya). Las muestras se sembraron en placas de agar chocolate y agar-sangre, preparadas con TSA (Agar de Tripticasa Soya) con 5% de sangre de carnero, según metodología convencional (15).

El *S. pneumoniae* se aisló sobre la base de las características de alfa-hemólisis, coloración Gram, prueba de NaCl y bilis esculina, y la prueba de susceptibilidad a la Optoquina (15).

Se realizó la prueba de sensibilidad en disco empleándose la técnica de Bauer et al modificada para *S. pneumoniae*, para 7 antibióticos: cefaclor, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina, rifampicina y trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX).

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de penicilina se empleó la técnica del Epsilon-test o E-test (AB Biodisk). Esta técnica consiste en la aplicación sobre una placa de agar, de una tira de papel impregnada con un gradiente exponencial, predefinido y estable de un antibiótico. Luego de la incubación se observa un elipsoide simétrico de inhibición del crecimiento. La zona de intersección del crecimiento y la tira determina el valor de MIC en µg/ml (16). Todas las muestras

fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

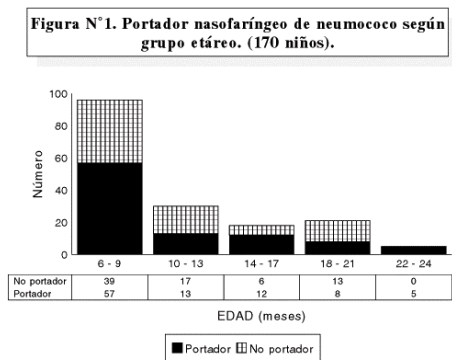
En el presente estudio se emplearon los estándares de interpretación de los diámetros de inhibición y del MIC de penicilina para neumococo, aprobados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1995) (17).

La determinación de los factores asociados a la presencia de cultivos positivos de neumococo, se evaluó con la prueba de Chi cuadrado y la corrección de Yates.

## RESULTADOS

El grupo de estudio estuvo formado por 170 niños entre 6 y 24 meses (media=11, Sd=4.85), encontrándose el 56% entre los 6 y 9 meses. El 47% fueron mujeres. En la evaluación clínica, el 16% de los niños presentó alguna patología respiratoria leve, 20% algún grado de desnutrición (Waterlow, 1973) y el 31% el antecedente de haber recibido antibióticos al menos en una oportunidad en los últimos 3 meses.

De las 170 muestras de secreción nasofaríngea se aislaron un total de 75 cultivos positivos a neumococos. El porcentaje de portadores nasofaríngeos de neumococo fue de 44%. La distribución de portador según grupo etéreo se muestra en la figura N°1. El mayor porcentaje corresponde a los grupos etéreos de 18 a 21 meses (62%) y de 10 a 13 meses (57%).



El porcentaje de portador nasofaríngeo de neumococo fue mayor en el grupo con patología respiratoria (59.3%) en comparación con los portadores sanos (41.3%), no siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Así mismo, no hubo diferencias significativas en cuanto al estado nutricional, uso de antibióticos ni hospitalizaciones previas. La presencia de tres

o más niños en la familia condicionó mayor porcentaje de portadores (70.3%) versus la presencia de menor número de niños (37.4%), siendo ésta la única diferencia estadísticamente significativa (Tabla N°1).

La sensibilidad en disco para las 75 cepas aisladas se presenta en la tabla N°2. Los antibióticos con mayor porcentaje de cepas sensibles fueron penicilina (92%), rifampicina (89.3%) y clindamicina (88%). Los que presentaron mayor resistencia (alta e intermedia) fueron TMP/SMX (52%), cefaclor (24%) y cloranfenicol (22.7%). Quince cepas (20%) presentaron resistencia a un solo antibiótico, 11 cepas a 2 antibióticos (16%) y 6 cepas presentaron multiresistencia (8%).

Con relación al MIC de penicilina, el 90% de las

**Tabla N°1. Portador nasofaríngeo de neumococo y condiciones asociadas (170 niños).**

Condición	n	Cultivos positivos	Porcentaje portador
<b>Patología respiratoria</b>			
Ausente	143	59	41.3
Presente	27	16	59.3
<b>Estado nutricional</b>			
Eutrófico	136	58	42.6
Desnutrido	34	17	50.0
<b>Uso de antibióticos</b>			
Si	53	19	35.8
No	117	56	47.9
<b>Hospitalización previa</b>			
Si	14	7	50.0
No	156	68	43.6
<b>N° niños familia *</b>			
2 ó menos	123	46	37.4 **
3 ó más	37	26	70.3

\* Datos solo para 160 niños.

\*\* p = 0.0008514 (Yates)

**Tabla N°2. Sensibilidad en disco de *Streptococo pneumoniae* (75 cepas).**

ANTIBIOTICO	RESISTENTE n (%)	INTERMEDIO n (%)	SENSIBLE n (%)
Cefaclor	9 (12.0)	9 (12.0)	57 (76.0)
Clindamicina	1 (1.3)	8 (10.7)	66 (88.0)
Cloranfenicol	17 (22.7)	-	58 (77.3)
Eritromicina	1 (1.3)	13 (17.3)	61 (81.3)
Penicilina	-	-	69 (92.0)
Rifampicina	2 (2.7)	6 (8.0)	67 (89.3)
Trimetoprim/	25 (33.3)	14 (18.7)	36 (48.0)
Sulfamethoxazole			

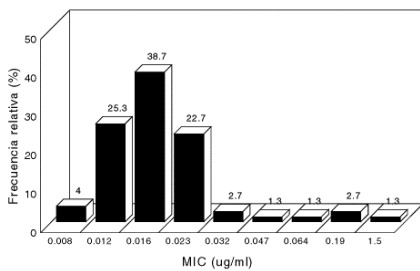
cepas de *S. pneumoniae* presentaron MICs menores a 0.023 µg/ml, el 95% menores a 0.047 µg/ml y el 99% menores a 0.19 µg/ml (Figura N°2). Según los estándares de interpretación del MIC, 71 cepas (94.7%) resultaron sensibles a la penicilina y 4 (5.3%) resistentes, incluyendo 3 cepas con resistencia intermedia (4%) y 1 con alta resistencia (1.3%)(MIC= 1.5 µg/ml)(Tabla N°3).

La correlación entre el MIC y la sensibilidad en disco para penicilina fue alta. Sesentainueve cepas (92%) resultaron sensibles a penicilina con la técnica de sensibilidad en disco, mientras que 71 (94.7%) lo fueron con la técnica del E-test. Una cepa considerada sensible con el disco de oxacilina (valor límite de 20mm), presentó resistencia intermedia con el E-test (0.064 µg/ml). Tres cepas consideradas resistentes con el disco de oxacilina fueron sensibles con el E-test.

**Tabla N°3. Sensibilidad antibiótica del *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina, según MIC (75 cepas).**

SENSIBILIDAD	n	%
Sensible (<0.06 µg/ml)	71	94.7
Intermedio (0.1-1.0 µg/ml)	3	4.0
Alta resistencia (>2 µg/ml)	1	1.3

**Figura N°2. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de penicilina para *Streptococcus pneumoniae* (75 cepas).**



## DISCUSION

En el presente estudio se encontró 44% de portadores nasofaríngeos de neumococo en niños menores de dos años que acuden a control de rutina en el consultorio externo de Pediatría. Este porcentaje es relativamente alto, comparable con los valores reportados para las guarderías infantiles (35-60%) (18) o para pacientes con infecciones respiratorias agudas, principalmente otitis media (40-90%) (12)(19).

La colonización nasofaríngea por neumococo son mayores en instituciones tales como guarderías, hospitales, escuelas militares, etc., donde hay un contacto cercano y prolongado entre las personas, lo que permite una mayor diseminación de la flora respiratoria (1) (18). Lo mismo ocurre entre los miembros de una familia. De acuerdo con esto y sumándose las condiciones de pobreza y hacinamiento en que vive la mayoría de niños del estudio, podríamos explicar el alto porcentaje de colonización encontrado, sobre todo en las familias en las que hay más de tres niños en el

hogar.

Se encontró mayor porcentaje de portadores nasofaríngeos de neumococo en el grupo con patología respiratoria, en comparación con los portadores sanos. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa, lo que podría deberse a un problema de poder del estudio, por el tamaño muestral.

En el presente estudio se ha encontrado 5.3% de resistencia de neumococo a la penicilina, incluyendo una cepa con alta resistencia. Estos resultados muestran un ligero incremento de la resistencia en nuestro medio, en relación al 3% en 1981-1993 y 3.3% en 1993-1994 (9) (8). Cabe resaltar que en ambos estudios no se encontraron cepas con alta resistencia.

El nivel de resistencia encontrado, ubica a nuestro país entre aquellos con baja resistencia a nivel mundial ( $\leq 5\%$ ), considerando los países en los que se han desarrollado estudios similares al presente (2) (3). En comparación con los países de Sudamérica, nos encontramos entre los que tienen más bajos niveles de resistencia (5).

Respecto a la resistencia a otros antibióticos, los niveles encontrados son relativamente altos en comparación a lo reportado a nivel mundial. Sin embargo, se debe tener cuidado en la interpretación de estos datos, dado que los resultados del presente estudio son sobre la base de la sensibilidad en disco y no al MIC (excepto para penicilina) (2) (3) (8).

El E-test es una nueva e innovadora técnica para la determinación cuantitativa del MIC, potencialmente aplicable a una gran variedad de drogas y microorganismos. Varios estudios han mostrado una buena correlación entre el E-test y el método de agar dilución, para cepas de neumococo (16). El E-test presenta, entre otras ventajas, que es una técnica fácil de realizar, reproducible y de rápida interpretación.

Los factores de riesgo para el desarrollo de resistencia del neumococo a la penicilina han sido ampliamente estudiados. Los principales factores son el uso de antibióticos, sobre todo de betalactámicos en los tres meses previos, asistencia a guarderías, anteriores episodios de otitis media, menor edad ( $< 3$  años) y raza blanca (12) (18).

En contraste con lo que ocurre para la mayoría de bacterias patógenas de la población pediátrica, la resistencia del neumococo a la penicilina no está mediada por la producción de betalactamasas. La resistencia a los antibióticos betalactámicos es

resultado de alteraciones en la afinidad de la proteína ligadora de penicilinas (PBP). Toda la resistencia del neumococo hasta hoy, está mediada cromosómicamente (3) (20).

Un aspecto muy importante es el reconocimiento que las cepas de neumococo con resistencia a antibióticos no es más ni menos virulentas que las cepas sensibles. La presentación de la enfermedad no se ve alterada cuando el organismo infectante es resistente, excepto en pacientes inmunocomprometidos, en quienes la presentación clínica puede ser más severa y tener peores resultados (14).

La mortalidad mundial para pacientes con bacteremia por neumococo ha permanecido sin variación, alrededor del 25%, en las últimas cuatro décadas. Los niveles actuales de resistencia del neumococo a penicilina y cefalosporinas, no están asociados a un incremento de la mortalidad en pacientes con neumonía neumocócica; por lo tanto estos antibióticos permanecen como terapia de elección para esta enfermedad (21).

Trabajos recientes establecen que el uso de penicilina a altas dosis (150,000 a 200,000 U/Kg./día) puede ser efectivo en el tratamiento de neumonía neumocócica por cepas con resistencia intermedia a la penicilina. Hasta el momento no se tiene certeza sobre la efectividad del uso de penicilina para el tratamiento de infecciones por neumococo con alta resistencia a la penicilina. La mayoría de autores recomienda el uso de beta-lactámicos más potentes (imipenem, cefotaxima, ceftriaxona) o agentes no beta-lactámicos (vancomicina, clindamicina, eritromicina y cloranfenicol) para infecciones por neumococo con alta resistencia o en pacientes críticamente enfermos (13)(21).

El efecto más dramático de la resistencia a la penicilina radica en los pacientes con meningitis por neumococo; cefotaxima y ceftriaxona son las drogas de elección para el tratamiento inicial de estas infecciones. La aparición de fallas en el tratamiento con estas drogas, ha planteado la sugerencia de agregar rutinariamente vancomicina, para aquellas áreas con alta prevalencia de cepas resistentes (22).

A la luz de estos conocimientos, se requiere de una selección muy cuidadosa de los antibióticos a utilizarse para una terapia empírica. Esta selección debe estar basada en el conocimiento de los patrones de sensibilidad del área geográfica del paciente, así como en la identificación, en el paciente, de factores de riesgo de muerte o de portar una cepa resistente (21).

Frente a este problema, a nivel mundial se han planteado estrategias para prevenir y controlar la emergencia y diseminación de microorganismos resistentes. Las estrategias son varias, pero quizás lo más importante es racionalizar el uso de antibióticos: optimizar el uso de profilaxia antibiótica y las opciones y duración de los tratamientos empíricos; mejorar la prescripción de antibióticos, vía educación de los médicos y control administrativo; monitorizar y prever la posible resistencia a determinado antibiótico; implementar la distribución, en todos los sistemas de atención de salud, de reglas para el uso de los más importantes grupos de antibióticos (23) (24).

En conclusión, la resistencia del neumococo a la penicilina es un creciente problema y representa un reto para la comunidad médica y la salud pública a nivel mundial. Afortunadamente en nuestro medio, los niveles de resistencia continúan bajos; sin embargo, es urgente establecer programas de vigilancia epidemiológica en los hospitales, así como establecer estrategias de prevención y control de la emergencia y diseminación de microorganismos resistentes en nuestro país.

#### **Correspondencia:**

Theresa Ochoa.

Av. Caminos del Inca 1840. Surco. Lima 33. Perú.

Teléfonos: 448-7734 / 430-6147 / 937-5816

#### **Agradecimientos**

A los asesores del trabajo, Doctores Herminio Hernández, Eduardo Chaparro y Humberto Guerra.

Este trabajo fue financiado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Laboratorios farmacéuticos ROCHE, Hoechst Marion Roussel y Eli Lilly y el Departamento de Infectología Pediátrica, Johns Hopkins University

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. En: Principles and practice of Infectious Diseases. Mandel GL, Bennet JF, Dolin R. Fourth Edition. Churchill Livingstone Inc. New York, 1995:1811-26.
2. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 1990; 3(2):171-96.
3. Schreiber JR, Jacobs MR. Antibiotic resistant pneumococci. Pediatr Clin N Am 1995; 42(3):519-37.

4. Doern GV, Brueggemann A, Holley HP Jr, Rauch AM. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from outpatients in the United States during the winter months of 1994 to 1995: results of a 30-center national surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1208-13.
5. Mogdasy MC, Valeta I, Hortal M. Monitoring of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Uruguay (May - December 1993). Abstract PCS-51. En el Libro de Resúmenes del 6th International Congress for Infectious Diseases, Prague-Czech Republic, 1994. International Society of Infectious Diseases.
6. Castillo L, Bustos R, González P, Siri MT, Mendoza C. Susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* aislado de infecciones invasivas en Chile. Resumen O-18.190. Libro de Resúmenes del VI Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica. Cartagena de Indias, Colombia. 1995.
7. Ruvinsky R, Rossi A, Regueira M. Invasive infections by *Streptococcus pneumoniae* in Argentine children: first national collaborative study of prevalence of serotypes and antibiotic resistance. Abstract E-038. Libro de Resúmenes del 36th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), New Orleans-USA, 1996. Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
8. Fukuda J, Echevarría J, Llanos F, Yi A, Palomino S, Gotuzzo E, et al. *Streptococcus pneumoniae* resistentes a Penicilina en Lima - Perú. *Rev Med Hered* 1996; 7(1):11-16.
9. Janof EN, Castellares G, Zerpa RL, Moran J, Moody J, Gray CW, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* in Peruvian children 1981-1993, Abstr K6. En el libro de Resúmenes del 35th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco-USA, 1995. Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
10. Adachi JA. Actividad in vitro de agentes antimicrobianos selectos frente a cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* beta-hemolítico (Tesis de Bachiller en Medicina). Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 1992.
11. Villa E. Serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* en niños (Tesis de Bachiller en Ciencias). Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 1991.
12. Arnold KE, Leggiadro RJ, Breiman RF, Lipman HB, Schwartz B, Appleton MA, et al. Risk factors for carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Memphis, Tennessee. *J Pediatr* 1996; 128(6):757-64.
13. Friedland, IR. Comparison of response to antimicrobial therapy of penicillin-resistant and penicillin-susceptible pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14(10):885-90.
14. Friedland IR, McCracken GH Jr. Management of infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 1994; 331(6):377-82.
15. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 1. American Society for Microbiology. Washington D.C., 1995.
16. Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM, Tenover FC. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E-Test. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1):159-63.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixth informational supplement M100-S5. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Villanova, Pa.
18. Boken DJ, Chartrand SA, Smith Moland E, Goering RV. Colonization with penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in urban and rural child-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(8):667-72.
19. Gehanno P, Lenoir G, Barry B, Bons J, Boucot I, Berche P. Evaluation of nasopharyngeal cultures for bacteriologic assessment of acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(4):329-32.
20. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl 1):S85-8.
21. Pallares R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Vildrich PF, et al. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med* 1995; 333(8):474-80.
22. Gold HS, Moellering RC. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 1996; 335(19):1445-53.
23. Goldmann DA, Weinstein RA, Wenzel RP, Tablan OC, Duma RJ, Gaynes RP, et al. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. *JAMA*

1996; 275(3):234-40.  
24. O'Brien TF. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to

monitor and manage it locally. Clin Infect Dis 1997; 24(Suppl 1):S2-8.