

**IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA, MOLECULAR; SEROLÓGICA DE *Streptococcus pneumoniae*,
Y DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A PENICILINA Y ERITROMICINA****EN LA CIUDAD DE COCHABAMBA*****Microbiological molecular identification and serologic of Streptococcus pneumoniae and
determination of the susceptibility to penicilin and eritromicin
in the city of Cochabamba***

*Zulema Bustamante Garcia
*Fatima Funes Espinoza
*Jenny Zamora Balderrama
*Adela Panozo
*Liz Villarroel
*Gabriela Suarez
**Rosario Castro
***Patricia Rosales

Recibido: 23 de julio de 2009; Aceptado: 19 de septiembre de 2009

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es uno de los principales patógenos causantes de infecciones respiratorias e invasivas, por lo que es importante identificar rápidamente este microorganismo y determinar la susceptibilidad a los antibióticos frecuentemente utilizados, para la realización de terapias adecuadas. Con este fin se realizó la identificación de 32 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, a partir de pacientes con infecciones respiratorias e invasivas; para su identificación se utilizaron métodos microbiológicos convencionales y como pruebas confirmatorias, métodos moleculares por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando regiones de los genes *lyt A* y *ply* y métodos serológicos para la determinación del antígeno capsular. Se realizaron antibiogramas para determinar la susceptibilidad a Penicilina y Eritromicina. Los resultados revelaron, un mayor número de aislamientos en menores de 10 años y en mayores de 49 años y en relación a épocas estacionales, de aislamientos un mayor número durante los meses de invierno. En las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se encontró una sensibilidad disminuida a Penicilina (SDP) de 46.88 %; resistencia a eritromicina de 6.25 % y resistencia intermedia de 15,63%. Realizando un análisis estadístico de los tres métodos como pruebas de reconfirmación, se observó una correlación baja, por lo que la prueba de la optoquina con fines de reconfirmación para *Streptococcus pneumoniae*, es inferior a las pruebas serológica y molecular.

PALABRAS CLAVE: *Streptococcus pneumoniae*, PCR, identificación, genes *lyt A*, *ply*, antígeno capsular, sensibilidad penicilina, eritromicina.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is one of the main pathogens that cause breathing and invasive infections, that is why is important a quick identification of this microorganism and determine the sensitivity of the frequently used antibiotics, to execute appropriate therapies. With this purpose the identification of 32 isolates of *Streptococcus pneumoniae* from patients with breathing and invasive infections were carried out, conventional microbiological tests were applied for identification and for confirmation were used molecular techniques based on the chain reaction of polymerase (PCR), amplifying the regions of *lyt A* and *ply* genes and serological methods for the determination of the capsular antigen. Antibiograms were carried out in order to determinate the sensitivity to penicillin and erythromycin. The results showed a higher amount of isolates in children under 10 and adults over 49, and according to seasons, more isolates on winter months. Regarding sensitivity to antibiotics, we found a drop of 46.88% to penicillin, a drop of 6.25 to erythromycin and an intermediate drop of 15.63%. The statistical analysis among the three techniques used for reconfirmation revealed there is a low correlation among them. Therefore, optochin, used as a re-confirmation method, is lower than serological and molecular tests.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae*, identification; *lyt A*, *ply*, capsular antigen, sensitivity penicillin, erythromycin.

*Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Mayor de San Simón.

**Hospital Viedma

***Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA)

INTRODUCCIÓN

Los neumococos, *Streptococcus pneumoniae* son diplococos gram positivos que se caracterizan porque llevan una cápsula de polisacáridos que permite su identificación y serotipificación. Estos neumococos son habitantes normales de las vías respiratorias superiores en un 5 a 40% de los humanos, y son causantes de neumonías, sinusitis, otitis, bronquitis, bacteriemia, meningitis y otros procesos infecciosos en el tracto respiratorio.¹

El neumococo actualmente se ha constituido en uno de los primeros agentes causales de neumonías bacterianas y de otitis media aguda en todo el mundo. La neumonía neumocócica es responsable de 10 a 25% de todas las neumonías, estimándose una tasa de mortalidad mundial de más de 1 millón de decesos anuales en niños menores de 5 años y en personas mayores de 65 años.²

Los métodos que se utilizan para identificar *Streptococcus pneumoniae* incluyen pruebas microbiológicas clásicas como la prueba de la optoquina², sin embargo en la actualidad se utilizan otros como la determinación del antígeno capsular (método serológico)³ o métodos moleculares para la determinación de genes de virulencia, como la autolisina (lyt A) y la pneumolisina (ply), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ya fueron recomendados y utilizados en estudios anteriores.^{2,4,5,6}

En el tratamiento de las neumonías generalmente se utilizan β -lactámicos como la penicilina, y mácrolicos como la eritromicina.^{7,8} Sin embargo, en los últimos años se ha reportado un incremento de resistencia a los antibióticos tradicionalmente utilizados para infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*.^{9,10,11,12}

Estos datos justifican la necesidad de realizar investigaciones sobre este microorganismo, implementando nuevos métodos como el molecular y serológico para una específica y rápida identificación. También es necesario determinar la susceptibilidad a los antibióticos frecuentemente utilizados para las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*, debido a que en nuestra región se hace un uso indiscriminado de los antibióticos, por automedicación y prescripción médica sin el análisis previo de susceptibilidad, con los consiguientes fracasos terapéuticos. Es importante que la identificación de la bacteria, se realice con técnicas de alta sensibilidad, especificidad y estabilidad, lo que justifica la implementa-

ción y comparación de métodos: microbiológico, serológico y molecular aplicados para el diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*.

El objetivo del presente trabajo identificar las características moleculares y serológicas del *Streptococcus pneumoniae* y su susceptibilidad a penicilina y eritromicina en la ciudad de Cochabamba.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo es un estudio descriptivo, transversal y analítico. Se trabajó con 32 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, obtenidos por métodos microbiológicos convencionales, a partir de pacientes con infecciones respiratorias. 19 de los 32 aislamientos fueron remitidos por los laboratorios del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, Escuela Técnica de Salud, Hospital Albina Patiño, Seguro Social Universitario y Hospital Elizabeth SETON, al Laboratorio Asistencial y Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Simón; 8 de los 32 aislamientos se obtuvieron en el Laboratorio Asistencial de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Simón, a partir de 40 muestras clínicas de pacientes con diagnóstico de neumonía hospitalizados en el Complejo Hospitalario Viedma, de acuerdo a criterios de inclusión, según convenio establecido con la jefatura de Infectología de dicha institución y 5 de los 32 aislamientos, se obtuvieron de 103 muestras clínicas con diagnóstico presuntivo de tuberculosis pulmonar y con BAAR negativo procedentes de la Escuela Técnica de Salud e Instituto gastroenterológico. Los 32 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* se obtuvieron en el periodo de Octubre 2007 a Noviembre 2008

La toma de muestras se realizó de acuerdo a protocolos establecidos en el Laboratorio Asistencial de la Facultad de Bioquímica y Farmacia.

Métodos microbiológicos

Para la identificación microbiológica se realizó el cultivo en medio Agar sangre, tinción de gram, la reacción negativa a la catalasa de la colonia sospechosa y la prueba de la optoquina.¹³

Susceptibilidad a penicilina y eritromicina

Para determinar la susceptibilidad a estos antibióticos se realizó un antibiograma, siguiendo el método de Kirby

Bauer, utilizando discos de oxacilina de 1 ug, considerando como SDP (sensibilidad disminuida a la Penicilina) cuando presenta un halo de inhibición menor a 19 mm⁸ y para la eritromicina un disco de 15 ug, considerando resistente con un halo igual o menor a 15 mm y resistencia intermedia con un halo de 16-20 mm.

Métodos moleculares de confirmación

Para confirmar los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, se realizó la extracción de ADN, tomando algunas colonias y resuspendiendo en un Buffer (Tris-HCl10mM-EDTA1mM), llevando a Baño Maria por 20 minutos, y agregando cloroformo, después de la centrifugación se separó la fase acuosa que contenía el ADN crudo, con el cual se realizó la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores utilizados fueron Lyt A y Ply, descritos por Suzuki et al.⁴ Lyt A amplifica la región que codifica para la autolisina en *Streptococcus pneumoniae* y genera un producto de amplificación de 308 pb y Ply amplifica una región del gen de la pneumolisina de 329 pb. Las secuencias de los cebadores utilizados fue: Lyt A 5' - CAA CCG TAC AGA ATG AAG CGG - 3' y 5' - TTA TTC GTG CAA TAC TCG TGC G - 3. Cebadores Ply ; 5' - ATT TCT GTA ACA GCT ACC AAC GA - 3' y 5' - GAA TTC CCT GTC TTT TCA AAG TC-3.

Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización inicial 94 °C por 5 minutos y 35 ciclos de desnaturalización 94 °C por 10 segundos, hibridación a 58 °C por 15 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto y elongación final a 72 °C por 7 minutos. Los productos obtenidos fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y con bromuro de etidio 0.5 µg / ml.

Métodos serológicos

Para determinar la presencia del antígeno capsular, se utilizó el test BBL PNEUMOSLIDETM, es un método serológico de aglutinación en látex para la detección cualitativa de antígenos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, a partir de colonias aisladas o cultivos puros.

Comparación de métodos para reconfirmación de *Streptococcus pneumoniae*

Con el fin de evaluar los tres métodos con fines de reconfirmación, se trabajo con 27 de los 32 aislamientos iniciales, utilizando los métodos descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS, utilizando la prueba de chi-cuadrado de bondad de ajuste por el número de muestras, para determinar las diferencias entre los grupos etáreos y épocas estacionales.

Para establecer la diferencia de susceptibilidad a los antibióticos se utilizó el test de proporción con un 95% de intervalo de confianza.

Finalmente para comparar los métodos por su reproducibilidad con fines de reconfirmación, se realizó una valoración de sensibilidad y especificidad de la prueba molecular y la prueba serológica frente a la prueba de la optoquina.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA, Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Streptococcus pneumoniae*

Durante el periodo de estudio, se trabajó con un total de 32 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, identificados por la prueba microbiológica de la optoquina y confirmados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden apreciar en la figura 1 y figura 2, los resultados de la amplificación obtenida con los cebadores lyt A y ply.

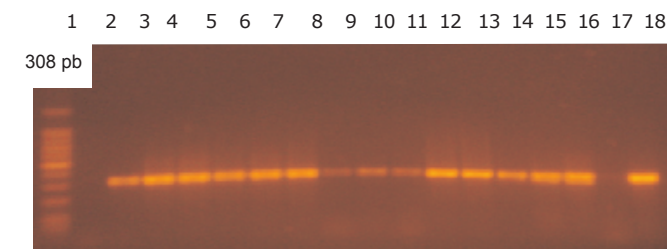


Figura 1. PCR realizada con gen Lyt A., 1; Marcador de tamaño, 2; control negativo 3, ATCC y de 4 a 18 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* identificados previamente por métodos microbiológicos.

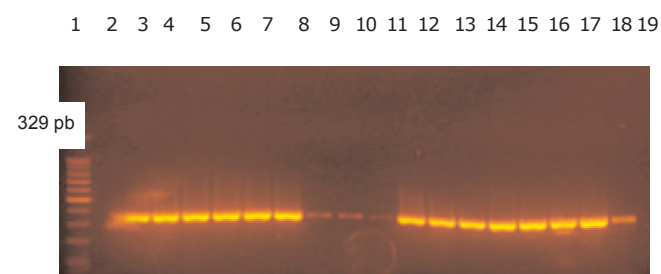


Figura 2. Producto de PCR gen Ply . 1; Marcador de tamaño, 2; control negativo 3, ATCC y de 4 a 19 aislamientos *Streptococcus pneumoniae* .

En relación a la presencia de neumococo en los diferentes grupos etáreos, se observó que existe un mayor número de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 10 años y adultos mayores a 49 años. (Figura 3).

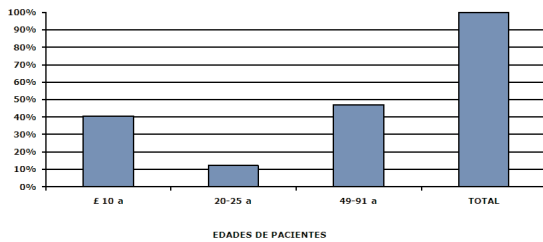


Figura 3. Grupos etáreos de pacientes con enfermedades neumocócicas respiratorias e invasivas causadas por *Streptococcus pneumoniae*

Aplicando a estos datos una prueba de χ^2 de bondad de ajuste, con $\alpha = 0.05$, el valor de χ^2 es : 11.07, se afirma que las frecuencias son significativamente diferentes entre los grupos de edad (valor $p = 0.000$).

En la figura 4, se observa la distribución de *Streptococcus pneumoniae* en el periodo de estudio 2007-2008, agrupado trimestralmente de acuerdo a épocas estacionales.

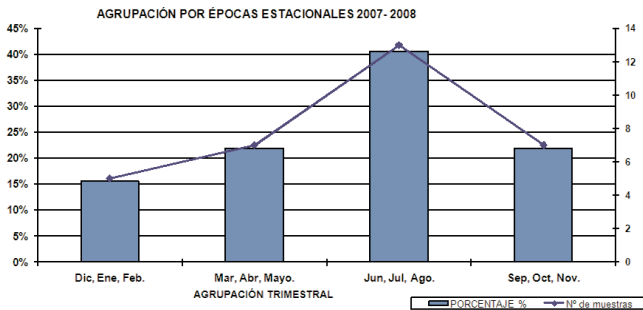


Figura 4. Aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, agrupado trimestralmente por épocas estacionales.

Aplicando a estos datos una prueba de chi-cuadrado χ^2 de bondad de ajuste, se obtuvo χ^2_0 de 9.75, a nivel de $\alpha=0.05$, con $g/ = 3$, el valor de χ^2 es: 7.82. Por tanto siendo $9.75 > 7.82$, permite afirmar que la distribución de las frecuencias es diferente en los trimestres del año, (valor $P = 0.021$). Por lo tanto mayor frecuencia de aislamientos, se presentó en los meses de invierno.

Susceptibilidad a la Penicilina

Del total de muestras el 53,13% (17 aislamientos) fueron sensibles a Penicilina sin embargo el 46,88% (15 aisla-

mientos) presentaron sensibilidad disminuida a la Penicilina (SDP).

Susceptibilidad a la Eritromicina.

De acuerdo a los resultados de susceptibilidad, la sensibilidad a la Eritromicina fue del 78,13 %, (25 aislamientos), el 15.63 % (5 aislamientos) tuvo una sensibilidad intermedia, y el 6.25 % (2 aislamientos) fueron resistentes.

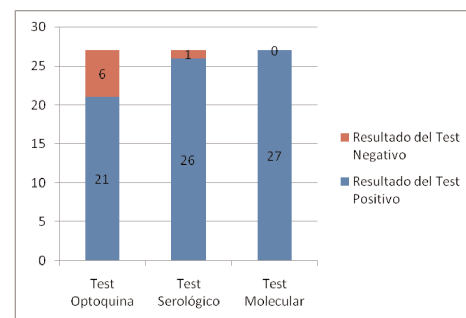
El test de proporción para comparar la sensibilidad a penicilina y eritromicina, demostró que la proporción de sensibilidad al antibiótico es mayor para la eritromicina que para la penicilina. (Tabla 1)

| Antibiótico | Sensibilidad (+) | Sensibilidad Disminuida | Total | Proporción | Proporción 1-P |
|--------------|------------------|-------------------------|-------|------------|----------------|
| Oxacilina | 17 | 15 | 32 | 0.53 | 0.47 |
| Eritromicina | 25 | 7 | 32 | 0.78 | 0.22 |

Tabla 1. Tabla de proporción entre la sensibilidad a penicilina y eritromicina

Comparación de la reproducibilidad de los métodos con fines de reconfirmación de *Streptococcus pneumoniae*

Para verificar la reproducibilidad de los métodos aplicados en el estudio, para reconfirmación con fines epidemiológicos, se conservaron las cepas aisladas en el medio de conservación Skim Milk a -20°C ; así mismo se conservó el material genético de cada cepa en TE (Buffer Tris EDTA) a -20°C . Se realizaron subcultivos de los aislamientos , a partir del medio de conservación utilizado. Para esto se trabajó con 27 de las cepas aisladas. Se repitieron las prueba de la optoquina y las pruebas serológicas, y a partir del material genético conservado se repitieron las pruebas moleculares- gen ply y gen lyt A. La figura 5, muestra que en la prueba de la optoquina de los 27 aislamientos el 77.78 % (21 aislamientos) tuvieron sensibilidad a la optoquina y el 22.22 % (6 aislamientos) fueron resistentes a este fármaco.



En la serología de 27 muestras, 26 fueron positivas y una negativa y en la prueba molecular las 27 muestras fueron positivas como se observa en la figura 5.

Para realizar la comparación entre las técnicas utilizadas, se aplicó un test estadístico de especificidad y sensibilidad concluyendo que los métodos molecular y serológico son altamente sensibles, específicas y reproducibles en relación al método microbiológico de la optoquina, cuando se aplica a las mismas muestras en dos momentos diferentes.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Durante el periodo de estudio se trabajó con muestras clínicas, y con aislamientos remitidos por los hospitales/laboratorios participantes, obteniéndose 32 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*. En relación a los grupos etáreos de los pacientes, se observó que existen principalmente dos grupos afectados por esta bacteria, que son niños menores de 10 años con un porcentaje de 40,63% (13 de 32 aislamientos) con edades comprendidas entre los 2 meses y 7 años; y adultos mayores a 49 años con un porcentaje de 46,88% (15 de 32); se presentó un grupo minoritario entre 20-25 años 12,50%, (4 de 32 aislamientos), estos casos son raros y podría deberse a que en los pacientes jóvenes, *Streptococcus pneumoniae* se comporta como un patógeno oportunista, ya que todos ellos se encontraban inmunodeprimidos, dos de ellos eran VIH +, y uno de ellos padecía de lupus eritematoso.

Respecto a los resultados en grupos etáreos, es importante mencionar que en estudios realizados en Latinoamérica, se reportó mayor frecuencia de infección en niños menores de dos años, disminuyendo después de los 10-15 años, para posteriormente incrementar dicha frecuencia en personas mayores de 60 años.^{2,12,14,15}

En relación al número de aislamientos obtenidos en las diferentes épocas estacionales, se observó un mayor número (13 de 32) en los meses de invierno; según el reporte de SEDES (2008) en estos meses existe mayor frecuencia de infecciones respiratorias agudas y neumonías; aumentando por tanto la posibilidad de que el neumococo se encuentre circulando en la población.

El test de susceptibilidad a penicilina, mostró una sensibilidad de 53,13% y un porcentaje de sensibilidad disminuida a la penicilina de 46,88%. Los datos nacionales proporcionados por INLASA (2005), muestran una sensi-

bilidad disminuida a la penicilina de 52%, dato similar al obtenido en esta investigación durante el periodo de estudio.

En la prueba de susceptibilidad a eritromicina, el 78,13% mostró sensibilidad; el 15,63% sensibilidad intermedia, y 6,25% resistencia; estos resultados son apoyados por los datos reportados a nivel nacional por INLASA que el año 2005, informa una resistencia del 7%. Es importante resaltar que en nuestro país todavía existe una buena sensibilidad a la eritromicina en relación a la penicilina. Sin embargo la susceptibilidad a penicilina y eritromicina es variable en diferentes países latinoamericanos.^{9,10,16,17} y en países europeos,¹⁸ coincidiendo en un incremento de resistencia en los diferentes años. El alto porcentaje de resistencia a penicilina en países de Latinoamérica, según Hortal y Camou⁷ es el resultado de dos fenómenos epidemiológicos: La importación de clones que poseerían atributos especiales de virulencia y eventos de transferencia de resistencia a cepas sensibles, que ocurren de manera independiente y localizada; así como el uso de este antibiótico en un esquema inicial de tratamiento, sin la realización previa del antibiograma.¹² También se ha indicado que las cepas resistentes a penicilina suelen ser resistentes a otros antibióticos.^{11,19}

La evaluación estadística de valoración de sensibilidad y especificidad para comparar la reproducibilidad de los métodos de identificación microbiológico, serológico y molecular, aplicados a subcultivos sucesivos de *Streptococcus pneumoniae*, muestra que el método microbiológico de identificación de la optoquina revela un aumento de resistencia a la optoquina del 22,22% en subcultivos sucesivos del neumococo, con una sensibilidad de 77,78%, esta disminución de la sensibilidad puede ser alterada por diversos factores, como las transformaciones genéticas o mutaciones especialmente a nivel del gen *atp C*, que codifica para la ATPasa^{7,20} o por subcultivos repetidos.

La prueba serológica de aglutinación de BBL™ Pneumoslide™, reportó un porcentaje de 96,30% de positividad y un 3,7% de negatividad. Comparando estos resultados con el test de la optoquina, muestra una sensibilidad de 96% y una especificidad del 100%, lo que permite concluir que el este método serológico de "Pneumoslide,™" tiene mayor reproducibilidad en relación a la prueba de la optoquina en subcultivos de neumococo. La prueba molecular dio 100% de positividad en los subcultivos.

Estos resultados indican claramente que los métodos moleculares, permiten reconocer características genéticas de las bacterias no reveladas por las técnicas convencionales. Los genes *lyt-A* y *ply* han sido muy usados en la identificación del *Streptococcus pneumoniae* en varios trabajos de investigación, como se describe en el de Suzuki et al,⁴ que utilizó estos genes como marcadores en la identificación molecular de *Streptococcus pneumoniae*, también, Ron Dagan et al,²³ indica que la técnica molecular de PCR es un test altamente sensible para la detección de *S pneumoniae*, entre otros, se encuentra el trabajo de Parra E, Castañeda E, Moreno²⁴ que utilizan la PCR para la Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* usando el gen *lyt-A* como marcador de *S pneumoniae*; por los resultados obtenidos con esta técnica su uso fue recomendado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia en su programa de vigilancia de *Streptococcus pneumoniae*.²

En la actualidad con el fin de asegurar la especificidad de este método se están implementando la técnica PCR-RFLP, para la detección de este microorganismo,⁶ más aún ya se reportaron varios trabajos utilizando la PCR en tiempo real, basada en la identificación de los genes *lyt A* y *ply*, utilizando sondas específicas, método que será importante implementar más adelante, para obtener inclusive mejores resultados.^{25,26}

Esta investigación nos permitió concluir que *Streptococcus pneumoniae* es agente causante de infecciones respiratoria agudas y de neumonías, presentándose con mayor frecuencia en niños menores a 10 años y adultos mayores a 49 años, circulando en mayor porcentaje de la población durante los meses de invierno. Se observó un alto porcentaje de susceptibilidad disminuida a la penicilina y en menor porcentaje a la eritromicina, datos que nos permiten recomendar la realización de cultivo y antibiograma antes de iniciar el tratamiento.

En relación a la reproducibilidad de los tres métodos utilizados con fines de reconfirmación para este microorganismos, se puede concluir que la técnica microbiológica no es una técnica reproducible y estable después de subcultivos sucesivos, para ser utilizada con fines de reconfirmación en el diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*, recomendando por lo tanto, el uso de las pruebas moleculares y serológicas, por presentar mayor sensibilidad y especificidad frente a la prueba de la optoquina.

BIBLIOGRAFIA

1. Brooks G, Batel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Editorial Manual Moderno. 7 Edición. 2004.
2. Instituto Nacional de Salud Colombia. Programa de Vigilancia de los serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* Manual de procedimientos. 2004. Versión 4. 33-99.
3. Trigo C. Bacteriología Básica. Ed. huellas SRL. 1998.
4. Suzuki N, Yuyama M, Maeda S, et al. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. J. Med. Microbiol. 2006. 55:709-714.
5. Tarja K, Identification of *Streptococcus pneumoniae*. Publications of the National Public Health Institute. A. 2006. 76 pages. <http://www.ktl.fi/portal/4043>, 3 de junio 2009.
6. Lull D, Lopez, R and Garcia E. Characteristic Signatures of the *lytA* Gene Provide a Basis for Rapid and Reliable Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2006 44(4): 1250-56
7. Falcó FV, Infección por neumococo. Medicine. 2006; 9(50): 3266-73.
8. Palavecino E. Puesta al día en el estudio de susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Chil. Infectol. 2002, 19 (2):101-6.
9. Chan W, Lovgren M, and Tyrreell G. Utility of the Pneumostide Test in Identification of *Streptococcus pneumoniae* in Blood Cultures and Its Relation to Capsular Serotype. J. Clin. Microbiol. 2009, 47 (5): 1559-1561
10. Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CT, et al. Evolution of *S. pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(10):959-967.
11. Saldías F, Flores L, Torres C, et al. Susceptibilidad a antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae* en población infantil y adulta de Santiago. 1997-2003 *Rev Méd Chile.* 2005; 133: 42-49.
12. Ruvinsky R, Gentile A, Regueira M. et al Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia *Arch. Pediatr. Urug.* 2004; 75 (1): 91-103.
13. Rosales P, Ruiz E. Manual de procedimientos bacteriológicos para *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N.meningitidis*. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud INLASA. 2005
14. Silva M. *Streptococcus pneumoniae*. 2007, Nov: 28. Disponible en la web: www.s-pneumoniae.blogspot.com. [citado: 23 octubre 2008]
15. Koneman EW, Allen S, Janda W, et al. Diagnóstico Microbiológico texto Atlas Color. Ed Médica Panamericana. 2003.
16. Camargos P, Bueno G, Mocelin H, et al. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America *Pediatric Respiratory Reviews.* 2006; (7) 209-214
17. Gil-Setas A, Mazón A, Torroba L, et al. Sensibilidad antibiótica y recomendaciones de tratamiento para *Streptococcus pneumoniae*. *Anales Sist. Sanit. Navarra.* 2004. 27 (1): 37-43.
18. Pradier C, Dunais B, Carsenti-Etesse H, et al. Pneumococcal resistance patterns in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997. 16: 644-647
19. Hortal M, Logvren M, De la Hoz T. Antibiotic resistance in *S. pneumoniae* in Latin America countries. *Microb Drug Resist* 2001; 7(4):391-401.
20. Cortez P, Albarracín A, Regueira M, et al. Characterization of In Vitro-Generated and Clinical Optochin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 2008. 46(6): 1930-34
21. Becton Drive casa comercializadora de sistemas de diagnóstico Estados Unidos. Disponible en la web (citado 2 de junio 2009)
22. Kellogg J, Bankert D, Elder C, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* Revisited. *J. Clin. Microbiol.* 2001 39(9): 3373-3375
23. Dagan R, Shriker O, Hazan I, et al. Prospective Study To determine Clinical Relevance of Detection of Pneumococcal DNA in Sera of Children by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1998. 36(3): 669-673.
24. Parra E, Castañeda E, Moreno J. Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por reacción en cadena de la polimerasa. *Bio-médica. Instituto Nacional de Salud. Colombia.* 2007. 27(3):454-460
25. Carbalho M de G, Tondella M, Mc.Caustland K, et al. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2007. 45 (8): 2460-66.
26. Mc. Avin J, Reilly P, Roudabush R, et al. Sensitive and Specific Method for Rapid Identification of *Streptococcus pneumoniae* Using Real-Time Fluorescence PCR. *J. Clin Microbiol.* 2001.39(10): 3346-3351