Prevalencia de Hemófilus Productores de β Lactamasa en Infecciones Pediátricas

Dres.: Walter Ledermann D.¹, Jacob Cohen V.¹⁻², María Teresa Siri A.¹⁻², Antonio Banfi P.¹

Prevalence of β - Lactamase Producing Haemophilus in Pediatric Infections

Fifty - two Haemophilus (24 H. influenzae, 4 H. parainfluenzae and 24 Haemophilus sp.) strains isolated from different infectious processes in L. Calvo Mackenna hospital from August 1980 to August 1982 were investigated for production of β lactamase using the Odugbemi iodometric technique and, in some strains, nitrocephin a cromogenic Cephalosporin. The sensitivity to Ampicilline was studied employing the disc - agar diffusion method.

In 1980, 2/5 (40%), in 1981 12/27 (44%) and in 1982 4/20 (20%) of the strains isolated were β - lactamase producers. There was correlation between β lactamase production and sensitivity to Ampicilline using the disc - diffusion method.

Desde que en 1974 Khan y Tomah describieron separadamente las primeras cepas de Hemóphilus influenzae resistente a ampicilina¹⁻² le siguieron numerosas publicaciones en distintas áreas del mundo que demostraban este mismo fenómeno³.

La resistencia de Hemóphilus influenzae a la

ampicilina está dada principalmente por la producción de una β lactamasa mediada por un plasmidio R⁴⁻⁵, aunque publicaciones recientes evidencian además resistencia debida a mecanismos aún desconocidos, que sugieren un tipo de alteración estructural de una o más de las proteínas que fijan la penicilina, fenómeno que ha sido demostrado en Streptococcus pneumoniae penicilino resistente β lactamasa negativos⁶.

Fracasos de tratamiento con ampicilina en niños con meningitis purulenta por Hemóphilus influenzae, a fines de la década del 70, nos hicieron

¹ Unidad de Infecciosos, Serv. de Ped., Hospital Luis Calvo Mackenna.

² Unidad de Microbiología, Depto. Salud Pública, Div. Cs. Med. Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

sospechar la aparición de cepas resistentes en nuestro medio hospitalario⁷ e implementar técnicas para la determinación de β lactamasas en *Hemophilus* y así demostrar la existencia de dichas cepas.

Este trabajo tiene por objeto mostrar los resultados obtenidos en detectar resistencia en *Hemophilus* a través de la determinación de la producción de β lactamasa en los últimos 3 años y la prevalencia de *Hemophilus* productores de β lactamasa en infecciones pediátricas.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 52 cepas de *Hemophilus* aislados de diferentes procesos infecciosos en niños que ingresaron al hospital Luis Calvo Mackenna entre Agosto de 1980 y Agosto de 1982.

Todas las muestras patológicas desde donde se aislaron éstas, fueron sembradas en agar sangre humana, agar chocolate + Iso-Vitalex y caldo Tripticase + sangre humana. El diagnóstico de género *Hemophilus* se hizo por los caracteres morfológicos macroscópicos de las colonias y microscópicos por tinción de Gram, más los caracteres de crecimiento. Para el diagnóstico diferencial de especie se utilizaron factores comerciales X (hemina) y factor V (N.A.D.)⁸.

Para el estudio de la sensibilidad se compararon las técnicas para determinar la producción de β lactamasa, con el antibiograma con disco por difusión en agar.

Se usaron dos técnicas para determinación de β lactamasas: la primera consiste en una variedad de la iodométrica de Odugbemi y col.⁹ Para esta se utiliza una solución de penicilina con 100.000 μ g/ml preparada a partir de penicilina sódica comercial, se diluye el lugol de la tinción de Gram al 1:2 y se selecciona un papel carta blanco que con esta solución diera un color azul-negro intenso. Como cepas control se usaron una *E. coli* (β lactamasa positiva) y un *Streptococcus* grupo A (β lactamasa-negativa).

El papel se corta en tiras de unos 3 x 7 cm y se baña en la solución de penicilina en P.B.S. preparada el mismo día. Se deposita en el fondo de una placa de Petri, cuidando que no queden burbujas de aire bajo ella. Se deposita una asada de un cultivo de 18 hrs. sobre un área de 3 mm de diámetro en la tira de papel. En la misma tira se depositan los cultivos de control positivo y negativo, dejando entre cada cepa una distancia de 1,5 cm. Luego se incuba en la estufa a 37°C por media hora. Al cabo de este tiempo se deja escurrir sobre el papel la solución yodurada, ennegreciéndose el papel en forma uniforme en 30 segundos. Casi de

inmediato se produce la decoloración en forma de halo donde fueran depositadas las cepas betalactamasa positiva, mientras las betalactamasa negativa permanecen de color oscuro. Al cabo de un par de minutos todo el papel comienza a decolorarse y ya la lectura es imposible. La decoloración en la zona de las cepas "positivas" se debe a la liberación de ácido penicilinoico, por rotura del anillo lactámico, el que reacciona con el yoduro, disociando el complejo que éste formaba con el almidón del papel.

La segunda técnica empleada fue el método cromogénico con Cefalosporina:¹⁰ Se disuelve 10 mg de cefalosporina 87/312 (Nitrocefín; Glaxo Ltd., Greenford, Middlesex, England) en 1 ml de dimetilsulfóxido. Se diluye con tampón fosfato pH 7.0 a una concentración de 500 mg/ml. Esta solución es de color amarillo y estable por 7 a 14 días a 4°C.

Se agrega 0.1 ml de esta dilución en un tubo donde hay una suspensión del microorganismo en estudio, se mezcla y se deja en observación hasta 10 minutos a temperatura ambiente. Si el microorganismo produce β lactamasa la mezcla cambia a color rojo en pocos minutos.

De las 52 cepas estudiadas a 44 se les efectuó el diagnóstico de sensibilidad por el método iodométrico y a 8 por el método cromogénico.

Para la técnica de difusión en agar se utilizaron discos comerciales de ampicilina (10 mcg) y cloramfenicol (30 mcg) colocados en la superficie de un agar chocolate + Iso-Vitalex, con una siembra de un inóculo de 18 horas a una concentración de 10⁶ bact/ml correspondiente al tubo Nº 0.5 de la escala de McFarland; considerando sensible sobre 14 mm de halo de inhibición para la ampicilina y 18 mm para el cloramfenicol después de 18 horas de incubación a 37°C.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la procedencia de los *Hemophilus* aislados. De las 52 cepas, 30 provienen de LCR, lo que demuestra que la meningitis purulenta es la principal patología comprobada que produce *Hemophilus* en niños hospitalizados en nuestro servicio.

Tabla 1.
Procedencia cepas *Hemophilus*

	1980	1981	1982	Total
L.C.R.	5	13	12	30
Sec. Otitis	0	8	1	9
Liq. Pleural	0	1	3	4
Sec. Conjuntival	0	4	1	5
Celulitis	0	1	2	3
Sec. Herida	0	0	1	1
Total por año	5	27	20	52

La Tabla 2 muestra las especies de *Hemophilus* aisladas. 24 corresponden a *Hemophilus influenzae* y 24 no se lograron tipificar por falta de factores.

Tabla 2.
Especies de *Hemophilus* aislados

	1980	1981	1982	Total
<i>Hemophilus influenzae</i>	4/5	18/27	2/20	24
<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	0	4/27	0/20	4
<i>Hemophilus</i> sp.	1/5	5/27	18/20	24

La Tabla 3 muestra la sensibilidad de las cepas de *Hemophilus* aisladas por la producción de β lactamasa. Durante el año 1981 la resistencia fue de un 44%. Durante el año 1980 el porcentaje probablemente no es representativo por que se obtuvo de aislamientos parciales y no del año completo. En el año 1982 que corresponde a 8 meses de aislamiento se observa una tendencia a disminuir el porcentaje de resistencia.

Tabla 3.
Sensibilidad *Hemophilus* por
 β lactamasa - ampicilina

	Nº Cepas	Sensibles	Resistente
1980 (Agosto-Dic.)	5	3	2 (40%)
1981 (Enero-Dic.)	27	15	12 (44%)
1982 (Enero-Agost.)	20	16	4 (20%)

La Tabla 4 muestra la sensibilidad de las cepas provenientes de LCR; al igual que de la Tabla anterior podemos sacar conclusiones del año 1981-82 que demuestra un 30.7% de resistencia en 1981, comparándolo con el año 1982 en que no se aisló cepas resistentes.

Tabla 4.
Sensibilidad de *Hemophilus* por
 β lactamasa en líquido céfalo-raquídeo

	Nº Cepas	Sensible	Resistente
1980	5	3	2 (40%)
1981	13	9	4 (30,7%)
1982	12	12	0 (0%)

La Tabla 5 muestra la sensibilidad de los *Hemophilus* provenientes de procesos extrameningeos. Durante el año 1981-82 el porcentaje de resistencia se ha mantenido más o menos constante a diferencia de lo que ocurre con las cepas aisladas de LCR.

Tabla 5.
Sensibilidad *Hemophilus* por
 β lactamasa en procesos extrameningeos

	Nº Cepas	Sensible	Resistente
1980	—	—	—
1981	14	6	8 (57%)
1982	8	4	4 (50%)

La Tabla 6 muestra la correlación que observamos entre las técnicas para determinar producción de β lactamasa y sensibilidad a ampicilina por difusión en agar, la que fue de un 100%.

Tabla 6.
Correlación entre producción de β lactamasa y
sensibilidad a ampicilina de *Hemophilus*

	β lactamasa positivo Nº Cepas	Resistencia por difusión en Agar R
1980	2/5	2/5
1981	12/27	12/27
1982	4/20	4/20

COMENTARIO

Este estudio puede parecer modesto y adolece de algunos defectos, ello se debe a las dificultades en que se desarrolla el trabajo asistencial de Microbiología y a las características de cultivo de este agente, pero es la primera comunicación sobre la prevalencia de *Hemophilus* resistentes en nuestro medio.

Algunas de las dificultades con que nos tropezamos fue la falta de un suministro permanente de los factores para tipificación de *Hemophilus*; esto se pudo lograr sólo en 24 cepas de las 52 estudiadas, de éstas, 20 resultaron *Hemophilus influenzae* y 4 *Hemophilus parainfluenzae*. Tampoco estamos en condiciones de certificar que los *Hemophilus influenzae* sean del tipo b. En segundo término, sería necesario comentar que la resistencia detectada por la producción de β lactamasa no fue comparada con la determinación de la concentración inhibitoria mínima (C.I.M.); de acuerdo a nuestros recursos la comparación se hizo con el método de difusión en agar que sólo tiene un valor cualitativo. A pesar de estos inconvenientes creemos que este trabajo es útil como aproximación a un problema real y que motivará otros estudios para conocer nuestra realidad nacional al respecto.

Los métodos empleados para la detección de la producción de β lactamasa son los recomendados por la Asociación Americana de Microbiología⁸; son altamente confiables y tuvieron una concordancia del 100% con el método de difusión en agar.

Llama la atención la alta prevalencia de cepas resistentes encontradas en nuestro medio, que es mayor a las experiencias extranjeras¹¹⁻¹²; lo que hace suponer que en las "cepas chilenas" aisladas de procesos patológicos, los plásmidos que codifican la resistencia tendrían una mayor difusión. Ahora bien, aunque tenemos sólo un año analizado en forma completa, los resultados obtenidos hasta ahora durante el año 1982, muestran una importante variación anual de la resistencia, fenómeno observado también en otros países del mundo¹³. Esta variación es aún más marcada para las cepas de líquido cefalorraquídeo.

Analizando los *Hemophilus* de diferente procedencia y los de líquido cefalorraquídeo, la mayor cantidad de cepas resistentes se observaron en los meses de invierno (Mayo-Agosto).

Desgraciadamente no existen publicaciones nacionales que nos permitan conocer el panorama anterior a 1980 y saber así, si estas variaciones son frecuentes en el tiempo y en cuantos años se ha llegado a las cifras preocupantes de la actualidad.

RESUMEN

Se estudiaron 52 cepas de *Hemophilus* (24 *H. influenzae*, 4 *H. parainfluenzae* y 24 *Hemophilus* sp.) aislados de diferentes procesos infecciosos en niños del hospital L. Calvo Mackenna entre Agosto de 1980 y Agosto de 1982.

Se estudió la producción de β -lactamasa mediante la técnica iodométrica de Odugbemi y en algunas cepas utilizando la Cefalosporina cromógena: (Nitrocefina). Se comparó con la sensibilidad a Ampicilina mediante técnica de difusión en agar con discos.

De las cepas aisladas resultaron productoras de β -lactamasa en 1980: 2/5 (40%); durante 1981: 12/27 (44%) y en 1982 4/20 (20%). Hubo estricta correlación con el estudio de sensibilidad a Ampicilina por difusión en agar.

REFERENCIAS

- ¹ Khan W., Ross S., Rodríguez W. et al. *Hemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin. J.A.M.A. 229: 298, 1974.
- ² Tomah M.O., Starr S.E., Mc Gowan J.E., et al. Ampicillin-resistant *Hemophilus influenzae* type b infection. J.A.M.A. 229: 295, 1974.
- ³ Riley H.D. Jr. *Hemophilus influenzae* infections Part II. C.R.C. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci 15: 277, 1981.
- ⁴ Elwell L.P., De Graaff J., Seibert D. et al. Plasmid-linked ampicillin resistance in *Hemophilus influenzae* type b. Infect Immunol. 12: 404, 1975.
- ⁵ Elwell L.P., Aunders Jr., Richmond M.H., et al. Relationship among some R plasmid found in *Hemophilus influenzae*. J. Bacteriol 131: 356, 1977.
- ⁶ Offit A. Paul, Campos M. Joseph, Stanley A. Plotkin. Ampicillin-Resistant, β lactamase-negative *Hemophilus influenzae* type b. Pediatrics 69: 230, 1982.
- ⁷ Banfi P. Antonio y col. Meningitis purulenta por *Hemophilus influenzae*. Estadística unidad de infecciosos Hospital Luis Calvo Mackenna (comunicación personal).
- ⁸ Lennette H. Edwing, Bolows Albert, Hausler William J. Jr., Truant P. Joseph. Manual of clinical Microbiology. Third Edition Pag. 330. American Society for Microbiology Washington D.C., 1980.
- ⁹ Odugbemi T.O., Hafiz S. y Mc Entegar M.G. Penicillinase producing *Neisseria Gonorrhoeae*: Detection by Starch paper technique. Publicación informal de la O.M.S. (Reprints: Department of Medical Microbiology, University of Sheffield Medical School, Beech Hill Road, Sheffield S 10 2 Rx, U.K.).
- ¹⁰ Lennette H. Edwin, Bolows Albert, Hausler William J. Jr., Truant P. Joseph. Manual of clinical Microbiology. Third Edition Pag. 484. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1980.
- ¹¹ Lerman, Stephen J., Brunken Jan M., Bollinger Mitzi. Prevalence of Ampicillin-Resistant Strains of *Hemophilus influenzae* causing systemic infection. Antimicrob. agents chemother. 19: 101, 1981.
- ¹² Mc Gowan E. John Jr., Terry M. Pamela y Nahmias J. Andre. Susceptibility of *Hemophilus influenzae* from Blood and cerebrospinal fluid to ampicillin, chloramphenicol, and trimethoprim sulfamethoxazole. Antimicrob. agents chemother 9: 137, 1976.
- ¹³ Howard A.J., Hince C.J., Williams J.D. Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Hemophilus influenzae*. Brit. Med. J. 1: 1957, 1978.