

Rev. Chil. Pediatr. 57(2): 128-133, 1986

Tres Años de Vigilancia de la Sensibilidad in vitro de *Haemophilus influenzae* Causantes de Infecciones Pediátricas

T.M. Lucía Reyes M.; Dra. Vateria Prado J.¹

Three Years Surveillance of the Susceptibility of *Haemophilus Influenzae* Isolated From Pediatric Infections

The increasing clinical importance of *Haemophilus influenzae* (H-i) in severe infections and the emergence of resistant strains to the most commonly used antibiotics lead us to set up an in vitro susceptibility surveillance along the years 1983 through 1985. Ninetytwo H-i strains isolated from patients of four hospitals at urban Santiago, Chile, were included (n = 26 in 1983; n = 27 in 1984; n = 39 in 1985). The isolates came from cerebrospinal fluid specimens (n = 15), blood cultures (n = 12), middle ear aspirates (n = 8), eye secretions (n = 14), pleural or traqueal fluids (n = 14), and other places (n = 3). The in vitro activity of Ampicillin, Chloramphenicol, Cefotaxime and Ceftriaxone (MIC 90 in µg/ml) were, in each case 50, 6.25, 0.19 and 0.78 µg/ml respectively. Resistance to Ampicillin fluctuated from 23.2% in the first year to 11.1% in the second and to 30.8% in the third year of this study, and was always mediated by a β Lactamase. Eight H-i strains (8.7%) were resistant to Chloramphenicol, and in 7/8 (7.6%) this fact was associated with resistance to Ampicillin (including bacteriae isolated from cerebrospinal fluid, pleural and middle ear aspirates). Ceftriaxone and Cefotaxime were active against all the strains of H-i thus studied.

(Key words: *Haemophilus influenzae*. Antibiotics. Sensibility. Ampicillin. Chloramphenicol. Ceftriaxone. Cefotaxime).

La importancia clínica creciente de *Haemophilus influenzae* (Hi) en pediatría como causante de infecciones severas nos ha motivado para mantener una vigilancia del perfil de sensibilidad de cepas de Hi aisladas de pacientes con diferentes afecciones durante los años 1983-84 y 85, a los antimicrobianos de primera elección como Ampicilina y Cloramfenicol, así como también a otros de alternativa como cefalosporinas de tercera generación^{1, 2, 3, 4, 5}.

Estudios realizados en el Area Oriente de Santiago han demostrado que Hi es el responsable del 33% de los casos de meningitis purulenta en niños, (Banfi A. y col. Resúmenes II Congreso Infectología) y aproximadamente del 44% de las otitis medias agudas en lactantes⁴.

En los últimos años, a partir de 1974, se ha detectado en forma progresiva y constante la emergencia de cepas de Hi resistentes a Ampicilina en diferentes países del mundo^{6, 7, 8, 9, 10} con una prevalencia entre 5% y 13%. Esta resis-

tencia está dada principalmente por la producción de una enzima betalactamasa del tipo TEM, la cual es codificada por un plasmidio que es transferible por conjugación⁷; este plasmidio tiene características idénticas a otros observados en enterobacterias por lo cual se ha planteado la posibilidad de intercambios genéticos in vivo entre Hi y enterobacterias.

Por otra parte también se han encontrado cepas de Hi resistentes a Ampicilina, que no producen la enzima betalactamasa, en estas cepas se ha evidenciado una modificación de las proteínas 3a y 3b de la membrana externa de Hi que impide la fijación de antibióticos betalactámicos¹¹, haciéndose el microorganismo mediante este mecanismo, impermeable a la Ampicilina.

En la actualidad, Cloramfenicoles la alternativa terapéutica en niños con infecciones sistémicas por Hi, pero desafortunadamente desde 1978, han aparecido cepas de Hi resistentes a este antimicrobiano; esta resistencia está dada fundamentalmente por la presencia de una enzima acetil transferasa, codificada también por un plasmidio¹². Existen numerosas publicaciones que demuestran que ella va unida con resistencia

1. Unidad de Microbiología. División Ciencias Médicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

de Ampicilina y Tetraciclina mediante el acoplamiento de genes de resistencia e integración de ellos en un plasmidio único, transferible, con peso molecular de 34×10^6 daltons^{13, 14, 15}. La capacidad de transferencias del plasmidio le otorga, al fenómeno, posibilidades de amplificación.

También se han descrito cepas de Hi resistentes a Cloramfenicol, no productoras de la enzima acetil transferasa. Esta resistencia obedecería a una alteración de la permeabilidad de la membrana externa, por disminución de una proteína de 40 kilo-daltons¹⁶.

Nuestro interés es mostrar las variaciones y características de la sensibilidad in vitro de cepas de Hemophilus influenzae aislados en nuestro medio en los últimos 3 años, como un antecedente que debe considerar el pediatra en el manejo terapéutico de infecciones graves por Hi.

MATERIAL Y METODO

Se estudió un total de 92 cepas de Haemophilus aisladas durante los últimos 3 años de procesos infecciosos en pacientes pediátricos hospitalizados en diferentes centros asistenciales: Hospital Luis Calvo Mackenna (n = 48); Hospital Roberto del Río (n = 27); Hospital San Juan de Dios (n = 7); Hospital Exequiel González Cortés (n = 9); Conín San Felipe (n = 1). Se incluyeron 26 cepas aisladas de 1983, 27 durante 1984 y 39 cepas durante 1985.

Las fuentes de aislamiento de estas cepas fueron: 50 de líquido cefalorraquídeo (LCR), 12 de hemocultivos, 8 de aspirados de oído medio, 14 de secreciones oculares, 3 de aspirados traqueales, 2 de líquido pleural y 3 cepas de quemadura, celulitis y pus de injerto respectivamente (Tabla 1). La identificación de las

cepas de Hi se efectuó de acuerdo con criterios internacionales aceptados¹⁷.

Se determinó la producción de betalactamasa en cada cepa mediante la técnica de Nitrocefina (cefalosporina cromógena)¹⁷.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los siguientes antimicrobianos: Ampicilina, Cloramfenicol, Ceftriaxona y Cefotaxima, siguiendo la técnica descrita en una publicación anterior⁹.

Para comparar los resultados de la actividad de los antimicrobianos se utilizaron los siguientes parámetros: CIM 50 (CIM en mcg/ml que es capaz de inhibir el desarrollo del 50% de las cepas) y CIM 90 (CIM en mcg/ml que es capaz de inhibir el desarrollo del 90% de las cepas). Se definió el porcentaje de cepas sensibles considerando como valor de corte 3 mcg/ml para Ampicilina, 8 para Cloramfenicol y 16 para Ceftriaxona y Cefotaxima.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa la distribución de las 92 cepas de Hemophilus de acuerdo con la edad de los pacientes y el origen del aislamiento.

Podemos ver que 68,5%⁶³ de las cepas corresponden a niños menores de 12 meses y que hay un porcentaje importante de cepas aisladas de niños con meningitis hasta los 2 años de edad. El 54,3% (50 de las cepas estudiadas corresponden a casos de meningitis purulenta y 13%¹² fueron aisladas de hemocultivos.

En la Tabla 2 se muestra la correlación de la producción de betalactamasa con el lugar de aislamiento de Haemophilus. Se encontraron cepas productoras de esta enzima en todos los sitios de aislamiento, con excepción de 14 cepas de

Tabla 1

Material de Estudio. 92 Cepas Hemophilus influenzae
1983-84-85

ORIGEN AISLAMIENTO DE HAEMOPHILUS

EDAD	Nº cepas	LCR	Hemocultivo	Oído	Ocular	Traqueal	Pleural	Celulitis Pus injerto
< 6 meses	22	11	3	3	5	-	-	-
6-12 meses	41	23	5	4	5	2	-	2
13-24 meses	18	10	3	1	3	-	1	-
2-7 años	11	6	1	-	1	1	1	1
TOTAL	92	50	12	8	14	3	2	3

secreciones oculares y 3 cepas procedentes de casos de celulitis e injerto respectivamente. De 50 cepas aisladas de LCR 24% producían la enzima betalactamasa, como ocurría también con 25% de las 12 cepas aisladas de hemocultivos. Durante estos 3 años de vigilancia, la prevalencia de Hi productora de betalactamasa y por ende resistentes a Ampicilina fluctuó entre 11,1% y 30,8%, con un promedio de 22,9%.

En la Tabla 3 se compara la actividad "in vitro" de Ampicilina, Cloramfenicol, Ceftriaxona y Cefotaxima sobre las 92 cepas de Haemophilus.

En el caso de Ampicilina, 76% de las cepas (70/92) fueron sensibles con CIM 50 de 0,78 µg/ml y CIM 90 de 50 µg/ml. Entre las cepas

resistentes se detectó producción de betalactamasa en 21 de 22.

Cloramfenicol resultó ser activo en 91,3% de las cepas con CIM 50 de 0,39 µg/ml y CIM 90 de 6,25 µg/ml.

Las cefalosporinas de tercera generación (Ceftriaxona y Cefotaxima) mostraron actividades 20 y 10 veces mayores que Ampicilina y Cloramfenicol respectivamente, reflejadas en CIM 50 ≤ 0,04 y CIM 90 de 0,19 y 0,78 µg/ml, resultando todas las cepas sensibles a ellas.

En la Tabla 4 se analiza el patrón de resistencia de 21 cepas de Haemophilus, el 14,1% (13 cepas) mostraron resistencia única a Ampicilina y 1,1% a Cloramfenicol.

Tabla 2

Prevalencia de Cepas de Haemophilus Influenzae Productoras de Betalactamasa

ORIGEN	1983		1984		1985		TOTAL	
	Nº cepas ¹	(%)	Nº cepas ¹	(%)	Nº cepas ¹	(%)	Nº cepas ¹	(%)
LCR	2/11		1/15		9/24		15/50	(24)
Hemocultivo	-		1/4		2/8		3/12	(25)
S. ótica	2/7		1/1		-		3/8	(37,5)
S. ocular	0/5		0/4		0/5		0/14	
S. traqueal	0/1		-		1/2		1/3	(33,3)
S. pleural	2/2		-		-		2/2	(100)
Otras*	-		0/3		-		0/3	0
	6/26	(23,2)	3/27	(11,1)	12/39	(30,8)	21/92	(22,9)

* Injerto, celulitis, quemadura

¹ Nº cepas betalactamasa +/total cepas estudiadas.

Tabla 3.

Sensibilidad In Vitro CIM (µg/ml) de 92 Cepas de Haemophilus Frente a 4 Antimicrobianos

Antimicrobiano	CIM 50 µg/ml	CIM 90 µg/ml	Cepas Nº	Sensibles* %
Ampicilina	0,78	50	70/92	76
Cloramfenicol	0,39	6,25	84/92	91,3
Ceftriaxona	≤ 0,04	0,19	92/92	100
Cefotaxima	≤ 0,04	0,78	85/85	100

* CIM

- Ampicilina < 3 µg/ml
- Cloramfenicol < 8 µg/ml
- Ceftriaxona < 16 µg/ml
- Cefotaxima < 16 µg/ml

Tabla 4

Patrón de Resistencia de 21 Cepas de Haemophilus

Resistente a:	Total	Hemocul-					
		LCR	tivo	S.pleural	S. oído	S. traqueal	S. ocular
Ampicilina	13	8	3	-	1	1	-
Cloramfenicol	1	-	-	-	-	-	1
Ampicilina y Cloramfenicol	7	4	-	2	1	-	-

Podemos observar que 7 de las cepas estudiadas (7,6%) mostraron resistencia combinada a Ampicilina y Cloramfenicol (4 de ellas fueron aisladas de casos de meningitis) 3/26 cepas aisladas en 1983, 1/27 en 1984 y 3/37 en 1985.

COMENTARIOS

Haemophilus influenzae (Hi) es causa frecuente de enfermedades infecciosas en la edad infantil; algunas observaciones indican que 95% de los niños menores de 5 años sufren por lo menos una infección por este agente^{18, 19}

Las 92 cepas incluidas en este estudio durante el período 1983-85 fueron obtenidas de procesos patológicos en pacientes pediátricos del área Oriente, Norte Occidente y Sur de Santiago por lo cual estimamos que la información obtenida refleja lo que está sucediendo en Santiago respecto a sensibilidad de Hi, aunque no podría ser extrapolado al resto del país.

La mayor proporción de cepas de Hi de este estudio fue aislada de niños menores de 12 meses, período en el cual dentro de la edad pediátrica son más frecuentes las infecciones graves por Hi.

El estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos incluidos indica que 76% del total de cepas son sensibles a Ampicilina y el porcentaje de resistencia de estos 3 años fluctuó entre 11 y 30%. De las cepas resistentes todas, con excepción de una, fueron productoras de betalactamasa, por lo tanto sigue siendo útil e importante la detección de esta enzima como un método rápido de detectar resistencia a Ampicilina.

La resistencia a Cloramfenicol es de baja frecuencia, un 91,3% de las cepas fueron sensibles a Cloramfenicol, antimicrobiano que sin embargo, no se puede considerar como alternativa segura de la Ampicilina ya que 4 cepas de LCR, 2 aisladas de empiema pleural y una de oído medio fueron resistentes a ambas drogas,

fenómeno que también ha sido descrito en centros extranjeros^{13, 14, 15} por lo cual se hace necesario contar con una técnica rápida para la detección de la enzima Cloramfenicol acetil transferasa. Esta técnica ya ha sido descrita²⁰ y se ha establecido de rutina en algunos centros, de modo que frente a infecciones sistémicas graves por Hi como meningitis, se determina la producción de betalactamasa y de acetil transferasa lo cual le permite dirigir en forma más racional la terapia.

Las cefalosporinas de tercera generación (Ceftriaxona y Cefotaxima) mantienen una excelente actividad in vitro frente a Hi 20 a 10 veces superior a Ampicilina y Cloramfenicol y todas las cepas fueron sensibles a ellas, como ya habíamos detectado previamente⁹. Ensayos clínicos utilizando Ceftriaxona en el tratamiento de meningitis purulenta por Hi y otros agentes, realizados en nuestro medio (Prado V. y col. Resúmenes II Congreso Panamericano de Infectología, Buenos Aires 1984, pág. 78) (Prado V. y col. Resúmenes II Congreso Chileno de Infectología, pág. 52) han mostrado una buena respuesta clínica y bacteriológica, con resultados semejantes a los obtenidos con la terapia habitual, lo cual ha sido observado también por investigadores extranjeros^{20, 21, 22, 23}

Igualmente los estudios clínicos en los cuales se ha utilizado cefotaxima en meningitis han demostrado su utilidad^{24, 25, 26, 27}.

El perfil actual de la sensibilidad de Hi en el área metropolitana mantiene la vigencia de Ampicilina y/o Cloramfenicol como terapia de primera elección en el tratamiento de las infecciones por este agente, pero hace aconsejable un estudio bacteriológico activo y dinámico incluyendo determinación de sensibilidad, de cada cepa de Hi que está provocando infecciones sistémicas graves, Frente a cepas de Hi con resistencia combinada tanto a Ampicilina como a Cloramfenicol las cefalosporinas de tercera generación constituyen una buena alternativa.

RESUMEN

La importancia clínica creciente de *Haemophilus influenzae* (Hi) en infecciones severas y la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos de elección motivó una vigilancia de la sensibilidad in vitro durante los años 1983, 1984 y 1985. Se incluyeron 92 cepas de Hi, aisladas en 4 hospitales de Santiago (26 en 1983, 27 en 1984 y 39 en 1985), que provenían de líquido cefalorraquídeo (n = 50), hemocultivos (n = 12), oído medio (n = 8), secreciones oculares (n = 14), secreciones traqueales o pleurales (n = 5) y de otras secreciones (n = 3). La actividad in vitro (CIM 90 en µg/ml) de Ampicilina, Cloramfenicol, Cefotaxima y Ceftriaxona fue 50; 6,25; 0,19 y 0,78 µg/ml respectivamente. La resistencia a Ampicilina fluctuó entre 23,2%, 11,1% y 30,8% en los 3 años, con un promedio de 24%, y fue mediada por betalactamasa en todas las cepas con excepción de una; ocho cepas (8,7%) resultaron resistentes a Cloramfenicol, en 7/8 (7,6%) simultáneamente con Ampicilina (cepas de LCR, líquido pleural y oído medio). Cefotaxima y Ceftriaxona resultaron activas frente al 100% de las cepas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los doctores Walter Ledermann, Ingeborg Prenzel, María Eugenia Pinto, Jorge Vergara y María Teresa Siri, el suministro de cepas de *Haemophilus*.

REFERENCIAS

- Herson V., Todd J.: Prediction of morbidity in *Haemophilus influenzae* meningitis. *Pediatrics* 59: 35, 1977.
- Dafari A., Asmar B. y col.: Systemic *Haemophilus influenzae* disease. An over view. *J. Pediatr.* 94: 355, 1979.
- Rubin L., Moxon R.: Pathogenesis of bloodstream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 41: 280, 1983.
- Siri M.T., Barfi A. y col.: Variación de la etiología de otitis media aguda en lactantes durante un período de 4 años de estudio (1979-1983). *Rev. Chil. Infectología* 2: 77, 1984.
- Ledermann W., Cohen J., Siri M.T.: Incidencia de *Haemophilus influenzae* productoras de betalactamasa en infecciones pediátricas. *Rev. Chil. Pediatr.* 54: 166, 1983.
- Schiffer M.S., Schneerson R. y col.: Clinical, bacteriological and immunological characterisation of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* tipo b. *Lancet*, August 3: 257, 1974.
- Madeiras A., O'Brien T.: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM type beta lactamase but little permeability barrier to ampicillin. *Lancet* 29: 716, 1975.
- Kahn W., Roso S. y col.: *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin. *JAMA* 229: 298, 1974.
- Reyes L., Prado V., Siri M.T.: Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de *Haemophilus influenzae* aislados de patología infantil. *Rev. Chil. Pediatr.* 55: 54, 1984.
- Lerman S.J., Brunken J.M., Bollinger H.: Prevalence of Ampicillin resistant strains of *Haemophilus influenzae* causing systemic infection. *Antimicrob. Agents Chemother* 18: 474, 1980.
- Parr T., Bryon L.: Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, B lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to betalactamantibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother* 25: 747, 1984.
- Roberts M., Srueson C. y col.: Characterization of chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 18: 610, 1980.
- Bryan L.E.: Transferable chloramphenicol and ampicillin resistance in a strains of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 14: 154, 1979.
- Kenny J.F., Isburaj C.D. y col.: Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type b resistant to both ampicillin and chloramphenicol. *Pediatrics* 66: 14, 1980.
- Campos J., García Tornel S.: Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatrics patients and contacts. *Antimicrob. Agents Chemother* 25: 706, 1984.
- Burns J., Mendelman P. y col.: A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 27: 46, 1985.
- Lenette E.H.: Microbiología clínica. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires 1982.
- Thornsberry C., Mc Dougal L.K.: Ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* 1. Incidence mechanism and detection. *Postgrad Med.* 71: 133, 1982.
- Thornsberry C., Mc Dougal L.K.: Ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* 2. Therapeutic considerations *Post grad Med.* 71: 1, 1982.
- Azemun P., Stull T., Roberts M., Smith A.: Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 20: 168, 1981.
- Del Río M.A., Chrane D., Shelton S. et al.: Ceftriaxone versus ampicillin and chloramphenicol for treatment of bacterial meningitis in children. *Lancet* 1: 1241, 1983.
- Steele R.W., Bradsher R.W.: Comparison of Ceftriaxone with standard therapy for bacterial meningitis. *J. Pediatr.* 103: 138, 1983.
- Mc Cracken G.M.: New concepts in the management of infants and children with meningitis. *Ped. Infect. Dis.* 2: 51, 1983.
- Wells T.G., Trang J.M., Brown A.L. et al.: Cefotaxime therapy of bacterial meningitis in children. *J. Antimicrob. Chemother* 14 (suppl B): 181, 1984.
- Kafetzis D.A., Brater D.C., Kapiki A.M., Papas C.V. et al.: Treatment of severe neonatal infection with cefotaxime. Efficacy and pharmacokinetics. *J. Pediatr.* 100: 483, 1982.

26. Kobayashi Y., Morikawa Y., Haruta T. et al.: Clinical evaluation of cefotaxime in the treatment of purulent meningitis in children. *Jap. J. Antibiot.* 34: 946, 1981.
27. Borderon J.C., Prieur D., Huguet B.: Concentrations du cefotaxime dans le liquide céphalorachidien chez des enfants atteints de méningite purulente. *Now. Press Med.* 10:580, 1981.