Evolución de la sensibilidad de *Neisseria meningitidis* a diversos antimicrobianos en el curso de intervenciones con quimioprofilaxis durante un brote epidémico

José A. Lepe[a], Celia Salcedo[b], Belén Alcalá[b] y Julio A. Vázquez[b]

[a]Laboratorio de Microbiología. Hospital de Riotinto. Huelva. [b]Laboratorio de Referencia de Meningococos. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. El objetivo del estudio fue evaluar la evolución de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) poblacionales frente a diversos antimicrobianos en aislamientos de *Neisseria meningitidis* obtenidos de portadores asintomáticos en el contexto de un brote epidémico de enfermedad meningocócica localizado en la provincia de Huelva en el que se realizó una intervención de quimioprofilaxis en población general.
MATERIAL Y MÉTODOS. El primer estudio de portadores se realizó en 427 individuos con objeto de conocer la presencia de la cepa causante del brote en población general. Como resultado se procedió a utilizar quimioproflaxis con rifampicina en la población entre 15 y 29 años (grupo etario con mayor presencia de la cepa epidémica), residentes en la población de Nerva.
A los 3 meses se realizó un nuevo estudio de portadores (507 personas) para evaluar el efecto de dicha quimioprofilaxis. Dada la evolución del brote epidémico fue necesario realizar a los 7 meses una nueva intervención con ciprofloxacino y transcurridos 2 meses un nuevo estudio de portadores (399 personas) para evaluar su efecto.
RESULTADOS. El número de cepas aisladas en los 3 estudios de portadores realizados fue de 59 (13,8%), 33 (6,5%) y 22 (5,5%), respectivamente.
El análisis de la evolución de la CIM_{50} y CIM_{90} de los distintos antibióticos del primer al segundo estudio de portadores (quimioprofilaxis con rifampicina) únicamente detectó cambios con significación estadística en las CIM de rifampicina. Así mismo, cuando se analizó la variación en la distribución de las CIM del segundo al tercer estudio (quimioprofilaxis con ciprofloxacino) fueron detectados cambios significativos particularmente en las CIM de cefotaxima.
Aunque existieron variaciones de CIM, los porcentajes de sensibilidad al principio y final del estudio no variaron.
CONCLUSIONES. El empleo de quimioprofilaxis masiva en el grupo de edad con mayor porcentaje de portadores de la cepa de *N. meningitidis* responsable del brote no modificó sensiblemente la sensibilidad antibiótica de los aislados, si bien puede observarse un aumento de los valores de la CIM_{50} y CIM_{90} en el caso de la rifampicina tras la intervención con este antimicrobiano, y en el caso de la cefotaxima tras las 2 intervenciones realizadas. Las sucesivas intervenciones de quimioprofilaxis con rifampicina y posteriormente con ciprofloxacino tuvieron un claro reflejo en el porcentaje portadores en la población general, con una tendencia claramente decreciente.

***Palabras clave: N. meningitidis*. Presión antibiótica. Portadores. Quimioprofilaxis.**

Evolution of *Neisseria meningitidis* sensitivity to various antimicrobial drugs over the course of chemoprophylaxis during an epidemic outbreak

INTRODUCTION. The aim of this study was to assess the evolution of the population MICs for various antimicrobial drugs against *Neisseria meningitidis* isolates obtained from asymptomatic carriers during a chemoprophylaxis campaign carried out for an epidemic outbreak of meningococcal disease in Nerva, a small town in Huelva province (Spain).
MATERIAL AND METHODS. A nasopharyngeal carrier study including 427 people was carried out to determine the incidence rate of the epidemic strain among the general population. On the basis of the results, chemoprophylaxis with rifampicin was administered to the population aged 15 to 29 years (age group showing the highest incidence of the epidemic strain among carriers) living in Nerva. Three months later a new carrier study was performed (507 people) to evaluate the effects of chemoprophylaxis. Given the evolution of the outbreak, seven months later a new intervention was required with ciprofloxacin chemoprophylaxis; a second carrier study (399 people) was performed two months later to evaluate its effect.
RESULTS. The number of strains isolated during the three carrier studies was 59 (13.8%), 33 (6.5%), and 22 (5.5%), respectively. Analysis of the changes in the MIC_{50} and MIC_{90} for the various antibiotics from the first to the second carrier study (rifampicin chemoprophylaxis) showed statistical differences only in the distribution of rifampicin MICs. Similarly, when changes from the second to the third

Correspondencia: Dr. J.A. Lepe.
Laboratorio de Microbiología. Hospital de Riotinto.
Los Cantos, s/n. 21660 Minas de Riotinto. Huelva. España.
Correo electrónico: josea.lepe.sspa@juntadeandalucia.es

Manuscrito recibido el 10-11-2005; aceptado el 1-6-2006.

study were analyzed (ciprofloxacin chemoprophylaxis), significant variations were detected for the cefotaxime MICs. Nevertheless, although there were changes in the MICs, the percentages of susceptibility from the beginning to the end of the study did not vary.

CONCLUSIONS. Massive chemoprophylaxis in the age group with the highest incidence of the epidemic strain among carriers did not clearly modify the antibiotic susceptibility of the isolates. However, a slight increase in the MIC_{50} and MIC_{90} was observed for rifampicin after the first chemoprophylactic intervention and for cefotaxime at the end of the study. Consecutive chemoprophylactic interventions with rifampicin and ciprofloxacin had an impact on the percentage of meningococcal carriers in the overall population, with a clearly decreasing trend.

***Key words: N. meningitidis*. Antibiotic pressure. Carriers. Chemoprophylaxis.**

Introducción

Durante los años 2002 y 2003 se detectó en la localidad de Nerva (Huelva) un brote de enfermedad meningocócica causado por una cepa de *Neisseria meningitidis* B 4:P1,15 que provocó tasas de incidencia en la población superiores a 145 casos por 100.000 habitantes (datos no publicados). Este brote permitió detectar una situación que abarcaba un territorio epidémico más amplio con comienzo en el año 2000. Al no existir vacuna contra el serogrupo B autorizada en la Unión Europea las medidas de control en principio fueron las habituales, administrando quimioprofilaxis a los contactos cercanos al caso índice para prevenir casos secundarios. La aparición de nuevos casos llevó, a la comisión de expertos creada a tal efecto y en base a la experiencia personal de alguno de sus miembros, a tomar la decisión de ampliar la quimioprofilaxis al grupo poblacional en el que fue detectado un mayor porcentaje de portadores nasofaríngeos de la cepa causante del brote, según la primera encuesta de portadores asintomáticos realizada (datos no publicados). Según este protocolo 1.352 personas entre 14 y 29 años recibieron tratamiento con rifampicina (600 mg/12 h p.o. durante 2 días) en la primera actuación y 1.401 personas fueron tratadas con ciprofloxacino (500 mg p.o. dosis única) en la segunda actuación 7 meses después. Tras la quimioprofilaxis masiva el brote se controló aunque siguieron apareciendo casos esporádicos en años posteriores.

El objeto de este trabajo fue evaluar la evolución de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) poblacionales a distintos antibióticos en los aislados de *N. meningitidis* obtenidos de portadores asintomáticos en las diferentes encuestas realizadas con motivo de las sucesivas intervenciones con quimioprofilaxis.

Pacientes y métodos

Descripción del estudio de portadores

Dentro de las medidas de control y evaluación del brote, se realizó un primer estudio de portadores nasofaríngeos que incluyó a 427 personas seleccionadas aleatoriamente del censo de población y estratificadas por edad y sexo con el objetivo de conocer la situación, objetivándose un porcentaje de la cepa epidémica (*N. meningitidis* B 4:P1,15) en portadores del 10,2% (6/59) y del 12,8% (5/39) en el grupo de 15 a 29 años, lo que condujo a la decisión de aplicar quimioprofilaxis masiva con rifampicina a este grupo de edad. A los 3 meses se realizó un nuevo estudio de portadores (507 personas seleccionadas aleatoriamente con el mismo diseño del primer estudio) para evaluar los efectos de esta campaña de quimioprofilaxis sobre la población, objetivándose que el porcentaje de la cepa epidémica en portadores había disminuido al 6% (2/33), pero aumentado porcentualmente en el grupo de 15 a 29 años al 20% (1/5). Debido a la evolución del brote se llevó a cabo una nueva quimioprofilaxis masiva con ciprofloxacino a los 7 meses de la primera, realizándose a los 2 meses un nuevo estudio de portadores (399 personas aleatoriamente seleccionadas) para evaluar su efecto, no encontrando aislamientos de la cepa epidémica en portadores. El número de portadores que estudiar fue calculado para que las muestras tuvieran significación estadística.

Cepas incluidas en el estudio

El estudio de susceptibilidad antibiótica incluyó 59 cepas provenientes del primer estudio (34 de serogrupo B, 7 Y, 3 W135, 1 C y 15 no grupables), el segundo incluyó 33 cepas (22 B, 4 Y, 1 W135, 1 C y 5 no grupables), y el tercer estudio incluyó 22 cepas (13 B, 4 Y, 1 C y 4 no grupables). Estas cepas representan la totalidad de aislamientos obtenidos en las 3 encuestas realizadas.

Estudio de sensibilidad

La sensibilidad a penicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, rifampicina, ciprofloxacino y sulfadiazina se realizó por el método de dilución en agar Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero, con un inóculo final de 10^4-10^5 UFC por *spot*. Los rangos de dilución empleados fueron: 0,007 a 2 μg/ml para penicilina, ampicilina y rifampicina, 0,0003 a 0,03 μg/ml para cefotaxima, 0,00007 a 0,06 μg/ml para ceftriaxona y 0,0003 a 0,12 μg/ml para ciprofloxacino. Para sulfadiazina se emplearon las diluciones 1, 5, 10, 25, 50 y 100 μg/ml y el medio no fue suplementado con sangre en este caso. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO_2 del 5% y fueron leídas manualmente siendo la CIM definida como la concentración más baja en la que el crecimiento no era visible[1].

Los puntos de corte usados para *N. meningitidis* fueron los recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)[2], siendo para penicilina, sensible ≤ 0,06 μg/ml, intermedio de 0,12 a 0,25 μg/ml y resistente ≥ 0,5 μg/ml; para cefotaxima y ceftriaxona, sensible ≤ 0,12 μg/ml; para ciprofloxacino, sensible, ≤ 0,03 μg/ml, intermedio 0,06 μg/ml y resistente ≥ 0,12 μg/ml[2]. Para ampicilina, sensible ≤ 0,12 μg/ml, intermedio 0,25-1 μg/ml y resistente ≥ 2 μg/ml. Para rifampicina, sensible ≤ 0,5 μg/ml, intermedio 1 μg/ml y resistente ≥ 2 μg/ml. Para sulfadiazina el punto de corte fue 10 μg/ml. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron usados como control y se incluyeron cada vez que los aislamientos eran estudiados. Así mismo se incluyeron 5 cepas de *N. meningitidis* (NM1, NM2.....NM5) como control en la determinación de CIM bajas. Estas cepas son utilizadas rutinariamente en la determinación de CIM en el Laboratorio de Referencia de Meningococos del ISCIII y permiten conocer el grado de reproducibilidad en la determinación de CIM muy bajas.

Estudio estadístico

Los resultados fueron registrados y analizados mediante un programa WHONET 5.2 (Organización Mundial de la Salud, OMS 2002) y las distribuciones de CIM fueron estudiadas con el programa estadístico SPSS 12.0 mediante pruebas de estadística no paramétrica: comparación de medianas y Kruskal-Wallis. Para la comparación de categorías de resistencias, los aislamientos se agruparon en sensibles y no sensibles, analizándose posteriormente mediante la prueba de la chi cuadrado.

Resultados

Los resultados de CIM_{50} y CIM_{90} de los 3 estudios de portadores se pueden observar en la tabla 1. Cuando se analizó la evolución de las distribuciones de CIM poblacionales del primer al segundo estudio (quimioprofilaxis con rifampicina) sólo se encontró variación con significación estadística en la CIM de rifampicina (test de Kruskal-Wallis: $p = 0,001$, test de la mediana: $p < 0,001$) (fig. 1). Cuando se analizó la variación de las distribuciones de CIM del segundo al tercer estudio (quimioprofilaxis con ciprofloxacino) las distribuciones de ciprofloxacino ($p < 0,001$), cefotaxima ($p < 0,001$) (fig. 1) y ampicilina ($p < 0,001$) mostraron variaciones significativas.

Los porcentajes de sensibilidad al principio y final del estudio no experimentaron variaciones estadísticamente significativas (prueba de la chi cuadrado $p > 0,05$).

Discusión

Existen muchos trabajos que evalúan la sensibilidad de aislamientos de *N. meningitidis* obtenidos en contextos clínicos (sepsis, meningitis, etc.). Sin embargo, estudios realizados sobre cepas obtenidas de portadores nasofaríngeos son menos abundantes y menos aún, aquellos que valoran cambios de sensibilidad de dichos aislados a lo largo de un brote epidémico[3,4]. Este trabajo analiza un aspecto poco estudiado de la enfermedad meningocócica: los cambios en los valores de CIM poblacionales en cepas procedentes de portadores asintomáticos sometidos a presión antibiótica de corta duración.

Cuando nuestros resultados se comparan con los obtenidos en un estudio realizado en Galicia entre 1996 y 1997[1] observamos que nuestros valores de CIM_{50} y CIM_{90} para los distintos antibióticos resultaron ser en general más elevados. Además, el porcentaje de aislamientos con sensibilidad intermedia a penicilina (Pen^I) de nuestro estudio era del 71,2% frente a un 35,9% en Galicia y de igual forma para aislados con sensibilidad intermedia a ampicilina (Amp^I) (89,8% frente a 62,9%). Una situación contraria se encontró con la sulfadiazina, siendo el porcentaje de cepas resistentes (Sdz^R) sensiblemente inferior (71,2% frente a 92,3%). Nuestro porcentaje de aislamientos Pen^I también eran mucho más alto que el descrito en Grecia, donde encontraban valores que oscilaban entre el 19 y el 48% según grupos de población[4].

En un estudio similar al nuestro realizado en Estados Unidos[5], donde se valoró el efecto de la quimioprofilaxis sobre los aislamientos de portadores, se observó un incremento del 12% en la resistencia a rifampicina. Sin embargo, en nuestro estudio no se puso de manifiesto la aparición de resistencias después de la intervención, aunque sí un aumento en los valores de CIM_{50} y CIM_{90} de rifampicina que aumentaron dos diluciones del primer al segundo estudio (de 0,032 a 0,125 y de 0,064 a 0,25, respectivamente) y aunque estos cambios no afectaron a la catalogación de los aislados como sensibles, sí demuestran desde el punto de vista estadístico un desplazamiento de su CIM hacia valores más altos. Intentar explicar estos cambios por mutaciones puntuales del gen *rpo*B parece arriesgado ya que normalmente llevarían a valores de CIM más altos, más aún cuando la presión antibiótica era de corta duración. Estos cambios de CIM podrían deberse a fenómenos de cambio de permeabilidad de la membrana que para una molécula de naturaleza hidrofílica como rifampicina podrían ser importantes y han sido descritos por otros investigadores[6-8].

El cambio en la distribución de CIM de ciprofloxacino del segundo al tercer estudio podría tener una base similar a la de rifampicina. La presión antibiótica de corta duración lleva a un cambio leve de CIM_{90} (de 0,03 a 0,07), suficiente para que dicha variación muestre valor estadístico, hay que tener en cuenta que se estudian variaciones de CIM poblacionales (CIM_{50} y CIM_{90}) y no individuales donde el cambio de una dilución no puede ser valorado al ser una variación admitida en la metodología. Sólo un estudio que incluyera la secuenciación de bombas de flujo y genes *gyrA* y *parC* en estos aislados permitiría analizar más en profundidad estos resultados.

Más difícil de explicar sería el cambio significativo en la distribución de cefotaxima (CIM_{90} de 0,016 a 0,064), que podría tener relación con cambios de permeabilidad en la membrana. Este mecanismo de alteración de porinas seleccionado por quinolonas y con traducción a los betalactámicos ha sido previamente descrito en *Klebsiella pneumoniae*[9].

Con independencia de lo expuesto anteriormente existe una variable de confusión que podría afectar a estos resultados: el aumento de la prescripción de antibióticos a la población debido al estado de ansiedad que fue provocando la aparición de nuevos casos, aspecto considerado en otros estudios[10] y que podría justificar la aparición de diferencias significativas en la distribución de CIM poblacionales de cefotaxima, antibiótico con el que no se intervino. En la población hubo un claro incremento en el uso general de antibióticos durante el tiempo de duración del brote

TABLA 1. **Variación de la CMI_{50} y CMI_{90} durante el estudio**

Antibiótico	Primer estudio		Variación de la distribución*	Segundo estudio		Variación de la distribución*	Tercer estudio	
	CIM_{50} (μg/ml)	CIM_{90} (μg/ml)		CIM_{50} (μg/ml)	CIM_{90} (μg/ml)		CIM_{50} (μg/ml)	CIM_{90} (μg/ml)
Sulfadiazina	24	192	NS	24	192	NS	48	96
Rifampicina	0,03	0,064	$p \leq 0,001$	0,125	0,25	NS	0,06	0,25
Ciprofloxacino	0,003	0,003	NS	0,003	0,003	$p < 0,001$	0,003	0,007
Cefotaxima	0,007	0,015	NS	0,007	0,015	$p < 0,001$	0,03	0,06
Ceftriaxona	–	0,003	NS	< 0,002	< 0,002	NS	< 0,002	0,003
Penicilina	0,12	0,25	NS	0,12	0,25	NS	0,12	0,25
Ampicilina	0,25	0,5	NS	0,25	0,5	$p < 0,001$	0,5	1

*Mediana y prueba de Kruskal-Wallis.
CIM: concentración inhibitoria mínima; NS: no significativo.

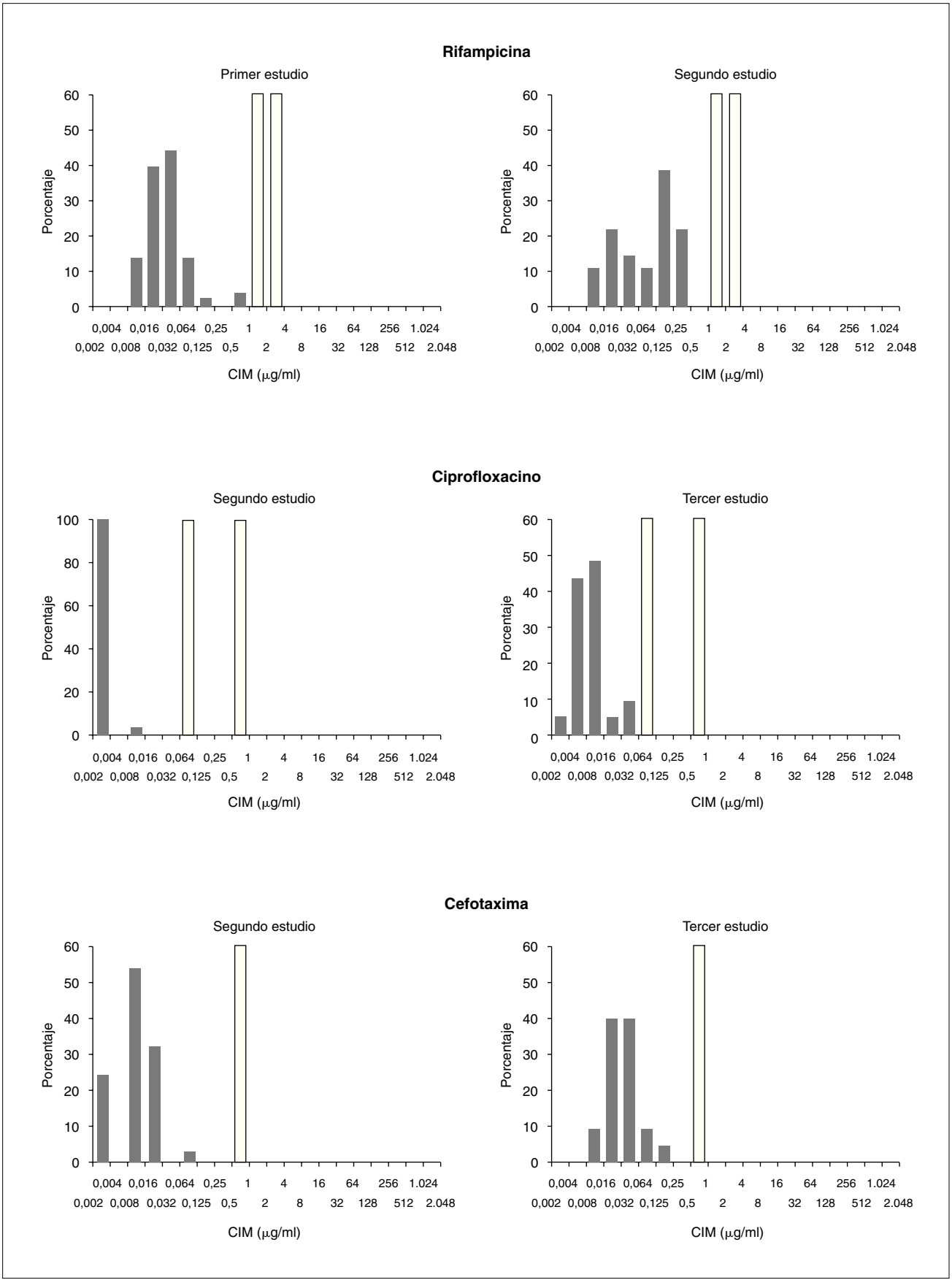

Figura 1. Comparación de los cambios de CIM en rifampicina, ciprofloxacino y cefotaxima durante el estudio.

(29,09% de incremento en la dosis diaria definida), más acentuado en el caso de cefalosporinas (67,67%), penicilina y amoxicilina-ácido clavulánico (38,41 y 20,75%, respectivamente). En el caso de rifampicina el antibiótico no fue utilizado en la población con excepción del utilizado en quimioprofilaxis, con lo que los cambios de CIM a dicho antibiótico no se justificarían por un aumento de prescripción.

Es probable, que la utilización de antimicrobianos en las intervenciones con quimioprofilaxis así como el incremento en la utilización de los mismos por motivos de ansiedad en el transcurso del brote, hayan podido modificar algunos aspectos que afectan a la ecología del germen, tal y como se ha visto en otras especies[11]. Estas modificaciones pueden tener su reflejo en los pequeños incrementos de las CIM_{50} y CIM_{90} observados en el estudio, si bien es cierto que los resultados no reflejan modificaciones en el grado de sensibilidad de los aislados, no observándose la selección de cepas resistentes en ningún caso.

Aunque las intervenciones de quimioprofilaxis alternadas, primero con rifampicina y posteriormente con ciprofloxacino tuvieron un claro reflejo en el porcentaje de portadores en la población, con una tendencia claramente decreciente, sólo tras la segunda intervención la cepa causante del brote epidémico dejó de ser encontrada (datos no publicados).

Bibliografía

1. Arreaza L, De la Fuente L, Vázquez JA. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1705-7.
2. CLSI/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement. M100-S15. CLSI/NCCLS, Wayne: 2005.
3. Arreaza L, De la Fuente L, Vázquez JA. Susceptibility to antimicrobial drugs used in the prophylaxis of meningococcal disease: situation after an epidemic wave. Rev Esp Quimioter. 2000;2:182-6.
4. Tzanakaki G, Blackwell CC, Kremastinou J, Kallergi C, Kouppari G, Weir DM. Antibiotic sensitivities of isolates from patients and carriers in Greece. Epidemiol Infect. 1992;108:449-55.
5. Jackson LA, Alexander ER, DeBolt CA, Swenson PD, Boase J, McDowell MG, et al. Evaluation of the use of mass chemoprophylaxis during a school outbreak of enzyme type 5 serogroup B meningococcal disease. Pediatr Infect Dis J. 1996;15:992-8.
6. Arreaza L, Salcedo C, Alcalá B, Vázquez JA. What about antibiotic resistance in *Neisseria lactamica*? J Antimicrob Chemother. 2002;49:545-7.
7. Vázquez JA. The resistance of *Neisseria meningitidis* to the antimicrobial agents: an issue still in evolution. Rev Med Microbiol. 2001;12:39-459.
8. Abadi FJR, Carter P, Cash P, Pennington TH. Rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:646-51.
9. Sanders CC, Sanders WE, Goering RV, Werner V. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, β-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. Antimicrob Agents Chemother. 1984;26:797-801.
10. Stuart JM, Robinson PM, Cartwright K, Noah ND. Antibiotic prescribing during an outbreak of meningococcal disease. Epidemiol Infect. 1996;117:103-5.
11. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. Emerg Infect Dis. 2002;8:347-54.