

# Sensibilidad de *Haemophilus influenzae* aislados en España a 17 antimicrobianos de administración oral

Belén Aracil<sup>a</sup>, José Luis Gómez-Garcés<sup>a</sup>, Juan Ignacio Alós<sup>a</sup> y Grupo de Estudio de Infección en Atención Primaria de la SEIMC (IAP-SEIMC)<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid. España.

<sup>b</sup>IAP-SEIMC: Hospital Puerta del Mar (Cádiz), Hospital Virgen de las Nieves (Granada), Hospital de Valme (Sevilla), Hospital Clínico (Zaragoza), Hospital Miguel Servet (Zaragoza), Hospital de Guadalajara (Guadalajara), Hospital Nuestra Señora de Sonsoles (Ávila), Hospital del Río Hortega (Valladolid), Hospital de la Santa Creu i San Pau (Barcelona), CAP. Bon Pastor y CAP. Manso (Barcelona), Hospital Juan Canalejo (A Coruña), Complejo Hospitalario Montecelo, Hospital Provincial (Pontevedra), Hospital Clínico San Carlos (Madrid), CE. Argüelles (Madrid), Hospital de Getafe (Getafe, Madrid), Hospital Severo Ochoa (Leganés, Madrid), Hospital de Móstoles (Móstoles, Madrid), Hospital Morales Meseguer (Murcia), Instituto Valenciano de Oncología (Valencia), Hospital Nuestra Señora de Aránzazu (San Sebastián).

**INTRODUCCIÓN.** El objetivo del estudio ha sido conocer la sensibilidad de 400 cepas de *Haemophilus influenzae* aisladas en 21 laboratorios españoles durante 1999 a 17 antimicrobianos de administración preferentemente oral.

**MÉTODOS.** Se utilizó un método de dilución en agar (HTM), interpretándose posteriormente los resultados según criterios del National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

**RESULTADOS.** Los porcentajes de sensibilidad a los antimicrobianos probados fueron: ampicilina, 59,5%; amoxicilina/ácido clavulánico, 99,2%; loracarbef, 66,2%; cefprozil, 70,2%; cefaclor, 76,2%; cefuroxima, 95%; ceftibuteno, 100%; cefpodoxima, 100%; cefixima, 100%; rifampicina, 99,8%; tetraciclina, 98,2%; cloranfenicol, 99,2%; ácido nalidíxico, 97,5%; ciprofloxacina, 100%; trovafloxacina, 100%; claritromicina, 74%, y azitromicina, 100%.

**CONCLUSIONES.** Para algunos antibióticos, la distribución geográfica de los porcentajes de sensibilidad no fue homogénea. El 24% de las cepas se mostraron productoras de betalactamasa, un porcentaje similar al obtenido en estudios multicéntricos publicados en la década de 1990. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de loracarbef, cefprozil y cefaclor fueron mayores para las cepas productoras de betalactamasa que para las cepas no productoras de la enzima. Sin embargo, las CIM de ceftibuteno, cefpodoxima y cefixima fueron similares para ambos grupos. Cinco cepas (1,25%) fueron betalactamasa negativas aunque se mostraban resistentes a ampicilina (CIM  $\geq 8$  mg/l) y amoxicilina/ácido

clavulánico (CIM  $\geq 4/2$  mg/l). Sólo 3 cepas presentaron sensibilidad intermedia a cloranfenicol (CIM, 4 mg/l). Estas mismas cepas y otras 4 más se inhibían con concentraciones de 4 mg/l o superiores de tetraciclina. Una sola cepa era resistente a rifampicina (CIM, 256 mg/l) y tetraciclina (CIM, 64 mg/l). Todas las cepas se consideraron sensibles a azitromicina (CIM  $\leq 4$  mg/l), ciprofloxacina y trovafloxacina (CIM  $\leq 0,5$  mg/l), aunque el 2,5% de ellas eran resistentes a ácido nalidíxico (CIM  $\geq 4$  mg/l).

**Palabras clave:** Estudio multicéntrico nacional. *Haemophilus influenzae*. Sensibilidad antimicrobianos.

Sensitivity of *Haemophilus influenzae* isolates in Spain to 17 oral antibiotics

**INTRODUCTION.** The objective of this study was to assess the sensitivity of 400 strains of *Haemophilus influenzae* isolated in 21 Spanish laboratories in 1999 to 17 oral antibiotics.

**METHODS.** An agar dilution method in HT medium was used for sensitivity testing; interpretation of the results followed NCCLS criteria.

**RESULTS.** Percentages of isolates susceptible to the antibiotics tested were as follows: ampicillin 59.5%, amoxicillin/ clavulanate 99.2%, loracarbef 66.2%, cefprozil 70.2%, cefaclor 76.2%, cefuroxime 95%, ceftibuten 100%, cefpodoxime 100%, cefixime 100%, rifampin 99.8%, tetracycline 98.2%, chloramphenicol 99.2%, nalidixic acid 97.5%, ciprofloxacin 100%, trovafloxacin 100%, clarithromycin 74%, and azithromycin 100%.

**CONCLUSIONS.** Geographic distribution of sensitivity rates was not homogeneous for some antibiotics. Around 24% of strains were betalactamase producers, requiring higher MICs of antibiotics such as loracarbef, cefprozil and cefaclor than non betalactamase producers. Nevertheless MICs of ceftibuten, cefpodoxime and cefixime were

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el 11.º Congreso Europeo de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Estambul, 2001.

Correspondencia: Dr. J.L. Gómez-Garcés.  
Servicio de Microbiología.  
Hospital de Móstoles.  
28935 Madrid. España.  
Correo electrónico: jlgarces@microb.net

Manuscrito recibido el 21-12-2001; aceptado el 17-09-2002.

similar in both betalactamase producers and non-producers. Five strains (1.25%) were beta-lactamase (–), but resistant to ampicillin (MIC  $\geq$  8 mg/L) and to amoxicillin/clavulanic acid (MIC  $\geq$  4/2 mg/L). Only three strains showed intermediate sensitivity to chloramphenicol. These strains and four others were inhibited with  $\geq$  4 mg/L of tetracycline. Only one strain was resistant to tetracycline (MIC: 64 mg/L) and to rifampin (MIC: 256 mg/L). All strains were sensitive to azithromycin (MICs  $\leq$  4 mg/L) and all were sensitive to ciprofloxacin and trovafloxacin (MICs  $\leq$  0.5 mg/L). However, ten strains (2.5%) were resistant to nalidixic acid (MIC  $\geq$  4 mg/L).

**Key words:** National surveillance study. *Haemophilus influenzae*. Antimicrobial susceptibility.

## Introducción

*Haemophilus influenzae* es un microorganismo responsable de infecciones del tracto respiratorio, incluyendo otitis, sinusitis, neumonía y exacerbaciones agudas de la broncopatía obstructiva, así como de infecciones sistémicas graves tal como meningitis y/o bacteriemia<sup>1,2</sup>.

Hasta los años 1960, ampicilina constituía el tratamiento de elección para las infecciones causadas por este agente, ya que todas las cepas se mostraban uniformemente sensibles. A partir de la siguiente década comenzaron a describirse cepas resistentes a este antimicrobiano debido a la producción de betalactamasa<sup>3-5</sup> incrementándose paulatinamente el número de cepas que presentan este mecanismo de resistencia en casi todas las regiones y países, alcanzando en muchos casos porcentajes entre el 25-35% de todos los aislamientos<sup>6-10</sup>.

En algunos de estos microorganismos se han descrito alteraciones en la estructura de sus proteínas fijadoras de penicilina (*penicillin binding proteins* o PBP), que afectarían tanto a cepas productoras de la enzima, como a aquellas otras no productoras del mismo y cuyo papel en la resistencia de estos microorganismos a compuestos betalactámicos es objeto de reciente discusión<sup>11,12</sup>.

Además, *H. influenzae* no sólo muestra resistencia a los antibióticos betalactámicos, sino que en ocasiones ésta se acompaña de resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, cotrimoxazol y macrólidos, con lo que la dimensión del problema de las resistencias de este patógeno se acrecienta de forma notable.

Como en otros microorganismos, el porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos varía de forma apreciable según el área geográfica y el período de tiempo analizado, por lo que la realización de estudios de vigilancia epidemiológica que combinen datos globales o nacionales, junto con otros más específicos o locales, ofrece una visión del problema más ajustada a la realidad de cada ámbito analizado.

En los últimos años, además, se han incorporado en la práctica clínica nuevos compuestos que pueden mostrarse eficaces frente a estos microorganismos, por lo que los estudios de sensibilidad son aún más recomendables como

un paso previo obligado para la evaluación clínica de estos antimicrobianos.

En el presente artículo se exponen los resultados de un estudio llevado a cabo en España, destinado a conocer la sensibilidad de 400 cepas de *H. influenzae* procedentes de aislamientos obtenidos durante 1999 frente a 17 antimicrobianos que pueden ser administrados por vía oral.

## Métodos

### Microorganismos

En conjunto, se recibieron 443 cepas de *H. influenzae* procedentes de 21 laboratorios pertenecientes a 10 comunidades autónomas de toda España, de las cuales resultaron viables 400, que fueron las que constituyeron el objeto del estudio. Cada cepa pertenecía a un paciente diferente y todas fueron obtenidas a lo largo de 1999. Se recogieron 240 cepas procedentes de pacientes adultos (60%) y 160 de niños (40%) y el origen de las mismas fue variado. Una suspensión de un cultivo puro en tubos conteniendo 10% de leche descremada y conservada a –70 °C se envió al laboratorio que centralizaba el estudio (Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles, Madrid) en hielo seco utilizando un servicio de mensajería.

Los microorganismos habían sido identificados a nivel de especie previamente en cada laboratorio participante empleando la metodología habitual<sup>2</sup>.

### Antibióticos

Los antibióticos estudiados fueron: ampicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) a concentraciones de 0,12 a 8 mg/l, en un principio y hasta 32 mg/l en las cepas resistentes (concentración inhibitoria mínima [CIM] > 8 mg/l), amoxicilina/ácido clavulánico (Smith-Kline-Beecham, Toledo, España) a concentraciones de 2:1 a 8:4 mg/l, loracarbef (Eli Lilly, Indianapolis, IN, EE.UU.) a concentraciones de 1 a 32 mg/l, cefprozil (Bristol, Myers-Squibb, Barcelona, España) a concentraciones de 1 a 32 mg/l, cefaclor (Sigma Chemical Co.) a concentraciones de 0,5 a 32 mg/l, cefuroxima (Glaxo-Wellcome, Madrid, España) a concentraciones de 0,5 a 8 mg/l, ceftibuteno (Schering-Plough, Kenilworth, NJ, EE.UU.) a concentraciones de 0,12 a 2 mg/l, cefpodoxima (Hoechst-Marion-Roussel, Romainville, Francia) a concentraciones de 0,12 a 2 mg/l, cefixima (Merck, Barcelona, España) a concentraciones de 0,03 a 2 mg/l, rifampicina (Sigma Chemical Co.) a concentraciones de 0,12 a 256 mg/l, tetraciclina (Sigma Chemical Co.) a concentraciones de 1 a 64 mg/l, cloranfenicol (Sigma Chemical Co.) a concentraciones de 0,5 a 4 mg/l, claritromicina (Abbott, Chicago, IL, EE.UU.) a concentraciones de 2 a 16 mg/l, azitromicina (Pfizer Inc., New York, NY, EE.UU.) a concentraciones de 0,5 a 16 mg/l, ácido nalidíxico (Sigma Chemical Co.) a concentraciones de 0,5 a 16 mg/l, ciprofloxacina (Bayer Q.F., Barcelona, España) a concentraciones de 0,0075 a 1 mg/l, y trovafloxacin (Pfizer Inc.) a concentraciones de 0,0075 a 1 mg/l.

### Estudio de sensibilidad

Las CIM de cada antibiótico se determinaron mediante un método de dilución en agar, empleando agar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK) enriquecido con 0,03 g/l de hematina bovina previamente disuelta en NaOH 0,01 M, 5 g/l de extracto de levadura y 0,015 g/l de  $\beta$ -NAD (HTM).

Para inocular las placas se utilizó un replicador de Steers, empleando un inóculo final de 10<sup>4</sup> UFC (unidades formadoras de colonias)/placa. Las placas con concentraciones seriadas de cada antimicrobiano se incubaron durante 24 h a 35 °C en atmósfera aerobia. Los resultados se interpretaron basándose en los criterios establecidos por el National Committee of Clinical Laboratory Standard (NCCLS)<sup>13</sup>. Además, la producción de betalactamasa se detectó mediante la prueba con nitrocefín en disco (Cefinase, Becton-Dickinson and Company, Cockeysville, EE.UU.), utilizándose la prueba de nitrocefín en tubo (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) como confirmatoria en aquellos casos en los que la prueba en disco

ofrecía resultados dudosos o bien negativos pero que correspondían a cepas resistentes a ampicilina. En el estudio se incluyeron como cepas de control *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766 y *H. influenzae* ATCC 10211.

### Análisis estadístico

La prueba estadística utilizada fue la chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Para analizar los resultados se empleó el programa estadístico EPI-INFO versión 6.04.

## Resultados

En el estudio se incluyeron un total de 400 aislamientos de *H. influenzae*, procedentes de 21 centros repartidos en 10 zonas geográficas diferentes de España. De todas ellas, el 24,5% eran productoras de betalactamasa, distribuyéndose entre el 9 y el 33% en los distintos laboratorios participantes según se refleja en la tabla 1.

La tabla 2 muestra la relación entre el tipo de muestra, la edad de los pacientes y la producción de betalactamasa en cada una de ellas. La producción de betalactamasa fue similar en los grupos de adultos y niños, de la misma manera que para la gran mayoría de los tipos de muestra remitidos, salvo los procedentes de exudados conjuntivales en niños donde la producción de betalactamasa se observó en aproximadamente el 40% de los aislamientos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

En las tablas 3 y 4 se recogen las CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>, intervalos, porcentajes de sensibilidad y porcentajes acumulativos de inhibición de las cepas productoras y no productoras de betalactamasa y los 17 antimicrobianos probados.

Azitromicina y claritromicina fueron los dos macrólidos elegidos ya que ambos son los que tienen puntos de corte definidos por el NCCLS frente a *H. influenzae*<sup>13</sup>. Según estos resultados, ninguna cepa necesitaba más de 4 mg/l de azitromicina para su inhibición, por lo que se consideraron sensibles en su totalidad, siendo además inhibidas por 2 mg/l el 78,7% de ellas. Tampoco se encontró ninguna cepa resistente a claritromicina (CIM  $\geq 32$  mg/l) aunque en el 26% las CIM del

antimicrobiano fueron de 16 mg/l catalogándose éstas como intermedias.

Las fluoroquinolonas evaluadas, ciprofloxacino y trovafloxacino, inhibieron a concentraciones de 0,5 mg/l a

TABLA 1. Procedencia de las cepas de *Haemophilus influenzae* y producción de betalactamasa

Área geográfica	Número de laboratorios	Número de cepas	Productoras de betalactamasa (%)
Andalucía	3	72	15 (20,8)
Aragón	2	30	10 (33,3)
Castilla-La Mancha	1	7	1 (14,3)
Castilla-León	2	22	2 (9,0)
Cataluña	2	46	8 (17,4)
Galicia	2	29	4 (13,8)
Madrid	5	123	36 (29,3)
Murcia	1	20	6 (30,0)
País Valenciano	1	12	3 (25,0)
País Vasco	1	39	13 (33,3)
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>400</b>	<b>98 (24,5)</b>

TABLA 2. Origen de las cepas, edad de los pacientes y producción de betalactamasa

Muestra	Número de cepas		Productoras de betalactamasa (%)	
	< 14 años	> 14 años	< 14 años	> 14 años
Espuito	3	133	33,3	23,3
Exudado conjuntival	79	9	40,0*	0
BAS	13	45	15,1	15,5
Exudado faríngeo	28	9	28,5	33,3
Exudado ótico	27	2	0,7	0
Sangre	2	15	0	5,3
Exudado vaginal	6	10	16,6	0,1
Exudado herida	2	3	0	0
Exudado uretral	—	6	0	33,3
Orina	—	3	0	33,3
LCR	—	2	0	0
Líquido pleural	—	2	0	0
Bilis	—	1	0	0
<b>Total</b>	<b>160</b>	<b>240</b>	<b>28,1</b>	<b>22,1</b>

\*( $p < 0,01$ )

BAS: broncoaspirado; LCR: líquido cefalorraquídeo.

TABLA 3. Sensibilidad de 400 cepas de *Haemophilus influenzae* a 17 antimicrobianos orales

Antibiótico	Intervalo (mg/l)	CIM <sub>50</sub> (mg/l)	CIM <sub>90</sub> (mg/l)	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina	$\leq 0,12$ - > 32	1	> 32	59,5	14,7	25,7
Amoxicilina/ácido clavulánico	$\leq 2/1$ -8/4	$\leq 2/1$	$\leq 2/1$	99,2	0	0,7
Loracarbef	$\leq 1$ - > 32	4	32	66,2	12,2	21,5
Cefprozil	$\leq 1$ - > 32	8	32	70,2	16,5	13,2
Cefaclor	$\leq 0,5$ - > 32	4	32	76,2	11,5	12,2
Cefuroxima	$\leq 0,5$ -8	1	4	95	5	0
Ceftibuteno	$\leq 0,12$ -2	0,25	0,5	100	0	0
Cefpodoxima	$\leq 0,12$ -2	$\leq 0,12$	0,25	100	0	0
Cefixima	$\leq 0,03$ -1	0,06	0,12	100	0	0
Rifampicina	$\leq 0,12$ -256	0,25	0,5	99,7	0	0,2
Tetraciclina	$\leq 1$ -64	$\leq 1$	$\leq 1$	98,2	1,5	0,2
Cloranfenicol	$\leq 0,5$ -4	$\leq 0,5$	1	99,2	0,7	0
Ácido nalidíxico	$\leq 0,5$ -8	1	2	97,5	0	2,5
Ciprofloxacino	$\leq 0,0075$ -0,5	$\leq 0,0075$	0,015	100	0	0
Trovafloxacino	$\leq 0,0075$ -0,5	$\leq 0,0075$	0,03	100	0	0
Claritromicina	$\leq 2$ -16	8	16	74	26	0
Azitromicina	$\leq 0,5$ -4	2	4	100	0	0

CIM: concentración mínima inhibitoria; S: sensibles; I: intermedias; R: resistentes.

TABLA 4. Porcentaje acumulativo de inhibición de las 400 cepas de *Haemophilus influenzae*

Antibiótico/CIM (mg/l)	≤ 0,0075	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	> 32
Ampicilina					6,7	13	42	59,5	74,2	77,5	81,7	81,7	81,7	100
Amoxicilina/ácido clavulánico									93	99,2	100			
Loracarbef								13,5	37,2	54,5	66,2	78,5	96,2	100
Cefprozil								8,2	30,5	48,5	70,2	86,7	97,5	100
Cefaclor							4,2	12,5	34,5	56	76,2	87,7	97,7	100
Cefuroxima							19,7	50,7	66,7	91	100			
Ceftibuteno					45,5	68,5	92	98	100					
Cefpodoxima					54,5	91,2	95,5	98,7	100					
Cefixima			27,2	55,7	92,5	95,5	96,7	100						
Rifampicina					32,7	73,5	92	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100
Tetraciclina								95,7	98,2	99,7	99,7	99,7	99,7	100
Cloranfenicol							68	92,5	99,2	100				
Ácido nalidíxico							32	73	97,5	99,2	100			
Ciprofloxacino	76	95,5	99	99,2	99,2	99,5	100							
Trovafloracino	68	86,2	95,5	99,2	99,2	99,5	100							
Claritromicina									18,2	37,7	74	100		
Azitromicina							12,5	35,2	78,7	100				

CIM: concentración inhibitoria mínima.

TABLA 5. Valores de CIM (mg/l) de 9 betalactámicos frente a 98 cepas de *Haemophilus influenzae* productoras de betalactamasa y porcentajes de cepas sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R) a dichos antimicrobianos

Antibiótico	Intervalo	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	S	I	R
Ampicilina	4- > 32	16	> 32	0	0	100
Amoxicilina/ácido clavulánico	≤ 2/1-4/2	≤ 2/1	≤ 2/1	100	0	0
Loracarbef	≤ 1- > 32	8	32	64,2	11,2	24,5
Cefprozil	≤ 1- > 32	8	16	74,5	11,2	14,2
Cefaclor	≤ 0,5- > 32	8	32	68,3	11,2	20,4
Cefuroxima	≤ 0,5-8	1	4	90,8	9,1	0
Ceftibuteno	≤ 0,12-2	0,25	0,5	100	0	0
Cefpodoxima	≤ 0,12-2	≤ 0,12	0,25	100	0	0
Cefixima	≤ 0,03-1	0,06	0,12	100	0	0

CIM: concentración inhibitoria mínima.

todas las cepas estudiadas, aunque en 10 de ellas (2,5%) las CIM de ácido nalidíxico fueron superiores o iguales a 4 mg/l.

De acuerdo con los valores definidos por el NCCLS, ninguna cepa fue resistente frente a cloranfenicol, aunque tres (0,75%) se catalogaron como intermedios con CIM de 4 mg/l. Estas mismas cepas y otras cuatro (1,75%) se inhibieron con concentraciones superiores o iguales a 4 mg/l de tetraciclina, necesitando una de ellas una concentración inhibitoria de 64 mg/l de este antibiótico. Esta misma cepa fue la única que se catalogó como resistente a rifampicina con una CIM de 256 mg/l, siendo el resto de la serie sensible a esta ansamicina con CIM inferiores o iguales a 0,5 mg/l.

Del total de las cepas estudiadas, 103 (25,75%) se consignaron como resistentes a ampicilina (CIM ≥ 4 mg/l) demostrándose la producción de betalactamasa en 98 de ellas. Las 5 cepas restantes necesitaban una CIM superior o igual a 8 mg/l de este antibiótico, para 4 de ellas la CIM era de 8 mg/l y para la restante de 32 mg/l, comprobándose repetidamente que la prueba con nitrocefín en disco daba resultados negativos, lo cual se corroboró además mediante la prueba en tubo, en estos casos<sup>14</sup>. Las cepas con fenotipo betalactamasa negativa resistente a ampicilina (BNRA), necesitaban igualmente CIM elevadas de amoxicilina/ácido clavulánico, dos de ellas 4/2 mg/l y las tres restantes 8/4 mg/l, para su inhibición,

afectándose también el resto de los betalactámicos estudiados. En ninguno de los aislamientos estudiados se encontró ninguna cepa productora de betalactamasa resistente a amoxicilina/ácido clavulánico.

Entre las cefalosporinas de espectro reducido probadas (loracarbef, cefprozil, cefaclor y cefuroxima), las CIM<sub>90</sub> fueron, en todos los casos de 32 mg/l excepto una de ellas, cefuroxima cuya CIM<sub>90</sub> fue 4 mg/l. Para estos antimicrobianos, los porcentajes de sensibilidad de las cepas fueron del 66, 25% para loracarbef, 70,25% para cefprozil, 76,25% para cefaclor y 95% para cefuroxima. Frente a este último compuesto, además, no se encontraron cepas resistentes. El 12, 25% de las cepas frente a loracarbef, el 16,5% frente a cefprozil, el 11,5% frente a cefaclor y el 5% frente a cefuroxima se consideraron con sensibilidad intermedia. En este grupo de cefalosporinas, sí se encontraron diferencias entre las cepas productoras de betalactamasa y las no productoras, fundamentalmente para cefaclor, para el que el 20,4% de las cepas fueron resistentes entre las productoras de la enzima frente al 9,6% para las betalactamasa negativas.

Las cefalosporinas de amplio espectro (cefixima, cefpodoxima y ceftibuteno) se vieron levemente afectadas, siendo ceftibuteno en la que se apreció más claramente esta circunstancia, ya que en 8 cepas la CIM de este antimicrobiano fue superior o igual a 2 mg/l, mientras que esta concentración de cefpodoxima sólo fue necesaria en

TABLA 6. Valores de CIM (mg/l) de 8 betalactámicos frente a 302 cepas de *Haemophilus influenzae* no productoras de betalactamasa y porcentajes de cepas sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R) a dichos antimicrobianos

Antibiótico	Intervalo	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	S	I	R
Ampicilina	0,12-32	0,5	1	98,3	0	1,7
Amoxicilina/ácido clavulánico	≤ 2/1-8/4	≤ 2/1	≤ 2/1	99,1	0	0,9
Loracarbef	≤ 1- > 32	4	32	66,9	12,5	20,5
Cefprozil	≤ 1- > 32	8	32	68,8	18,2	12,9
Cefaclor	≤ 0,5- > 32	4	16	78,8	11,5	9,6
Cefuroxima	≤ 0,5-8	1	4	91,1	8,9	0
Ceftibuteno	≤ 0,12-2	0,25	0,5	100	0	0
Cefpodoxima	≤ 0,12-2	≤ 0,12	0,25	100	0	0
Cefixima	≤ 0,03-1	0,06	0,12	100	0	0

CIM: concentración inhibitoria mínima.

5 cepas y cefixima inhibía a todas ellas con CIM entre ≤ 0,03 y 1 mg/l. Para este grupo de antimicrobianos la producción o no de betalactamasa fue un factor irrelevante, no afectándose ni la CIM<sub>50</sub> ni la CIM<sub>90</sub> de la serie.

Si se analizan los resultados obtenidos frente a los betalactámicos dividiendo las cepas entre los 2 grupos con producción o no producción de betalactamasa (tablas 5 y 6, respectivamente), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en las CIM<sub>50</sub> de loracarbef y cefprozil y en la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de cefaclor, con cifras mayores en el primer grupo, siendo este antibiótico en el que mejor se observa la diferencia de comportamiento entre cepas productoras y no productoras de la enzima, como ya se ha descrito clásicamente<sup>21</sup>.

De forma global la actividad de las cefalosporinas evaluadas en orden de mayor a menor actividad fue: cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefuroxima, cefaclor, cefprozil, loracarbef.

## Discusión

Desde la aparición de las primeras cepas de *H. influenzae* productoras de betalactamasa<sup>3-5</sup> han transcurrido más de 25 años y su progresión había sido evidente hasta los últimos años, en los que se observaba una estabilización en el porcentaje de estas cepas en las diferentes series, cercano al 30%. En nuestro estudio esta cifra se situó en el 24,5%, porcentaje similar al de otras series publicadas en diferentes áreas geográficas desde el comienzo de la década de 1990<sup>10,15-19</sup>. Además, en esta serie, los exudados conjuntivales suponen un alto porcentaje de los aislamientos, 88 de 400, lo que contribuye a elevar el número de cepas productoras de betalactamasa en el conjunto. Probablemente la reciente incorporación de las vacunas frente al antígeno capsular b y la subsiguiente disminución de aislamientos de este serotipo podría contribuir en el futuro al incremento de aparición de cepas de serotipo no b productoras de betalactamasas, ya que aunque la producción de la enzima ocurre más frecuentemente entre las cepas que pertenecen al serotipo b, lógicamente las no b aumentarán su porcentaje al disminuir las afectadas por el impacto de la vacuna<sup>6,10,19</sup>.

Tal y como era de esperar, el comportamiento de las cefalosporinas no fue uniforme, presentando una escala de actividad bien definida desde cefixima que inhibía todas

las cepas de la serie a una concentración de 1 mg/l hasta loracarbef, frente al que más del 20% de los aislamientos se mostraron resistentes. Además, las cefalosporinas de espectro ampliado fueron más activas y se afectaban ligeramente menos que las de espectro reducido en su actividad frente a cepas productoras de betalactamasas, fundamentalmente cefaclor para el que recientemente se ha demostrado una fuerte correlación entre el aumento de sus CIM y la producción de ROB-1<sup>21</sup>.

En nuestro estudio se encontraron 5 cepas con fenotipo BNRA, para las que la actividad de ampicilina no se afectaba por la adición del clavulanato. Estas cepas, descritas ya desde finales de los años 1980<sup>11,12</sup> y que ofrecen mecanismos de resistencia diferentes a la clásica producción de betalactamasas TEM-1 y ROB-1, podrían presentar alteraciones en la estructura de las PBP y cuya frecuencia no parece aumentar en los últimas series publicadas<sup>8-10,19,22</sup>. En nuestra serie, este tipo de cepas representó el 1,25%, porcentaje inferior al descrito en otros ámbitos geográficos u otras series.

La aparente discordancia entre los porcentajes de sensibilidad a ampicilina y a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico entre estas cepas se debió a la paradoja que supone que los puntos de corte establecidos por el NCCLS cataloguen como sensibles las cepas que presentan CIM inferiores o iguales a 4/2 mg/l de amoxicilina/ácido clavulánico, siendo por el contrario consideradas como resistentes a ampicilina aquellas que se inhiben con 4 mg/l de este último<sup>13</sup>.

La medida de la actividad de los macrólidos frente a algunos microorganismos y, especialmente, frente a *H. influenzae*, basada en los datos de sus CIM, es controvertida. Por una parte, la potenciación de algunos de estos agentes por el efecto aditivo que supone un metabolito hepático de la molécula original, como en el caso de claritromicina y su derivado 14-OH y por otra la aparente reducción de su actividad *in vitro* al ser probados en una atmósfera con aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>, pueden subestimar la eficacia de estos agentes<sup>7</sup>. En cualquier caso, en nuestra serie no encontramos ninguna cepa resistente a azitromicina, ya que sus CIM oscilaron entre 0,5 y 4 mg/l, inhibiéndose más del 75% de ellas con 2 mg/l.

Para claritromicina, el otro macrólido evaluado, y para el que el NCCLS, a diferencia de azitromicina, sí considera valores intermedios en sus CIM, tampoco se encontraron cepas resistentes, aunque el 26% de ellas presentarían unas CIM de 16 mg/l, catalogándose las como intermedias.

En conjunto, azitromicina fue de forma uniforme 4 veces más activa que claritromicina, tanto si valoramos la CIM<sub>50</sub> o la CIM<sub>90</sub> en su totalidad, 2 mg/l frente a 8 mg/l y 4 mg/l frente a 16 mg/l, como al evaluar los aislamientos de forma individual. La repercusión clínica en el tratamiento con ambos macrólidos de las infecciones causadas por *H. influenzae* no ha sido fehacientemente evaluada hasta el momento.

Las fluoroquinolonas probadas, ciprofloxacino y trovafloxacino, fueron muy activas, inhibiendo ambas más del 99% de los microorganismos estudiados a concentraciones muy bajas, del orden de 0,06 mg/l. No hubo prácticamente diferencias entre ambos representantes de dos generaciones distintas de fluoroquinolonas y tan sólo 2 cepas de las 400 ensayadas no se inhibían con 0,25 mg/l, aun cuando se mostraron sensibles de acuerdo con las categorías del NCCLS<sup>13</sup>. Por otra parte, el conjunto de las cepas frente a ácido nalidíxico, entendido éste como un "marcador vigilante" de la actividad de las quinolonas, en general, mostraba una buena sensibilidad, inhibiéndose así mismo más del 90% de ellas con 2 mg/l, lo que sugiere que todavía no parece encontrarse cercana la aparición de cepas resistentes a estos compuestos, al menos en proporciones importantes y en nuestro ámbito. En un futuro próximo, el previsible aumento en la utilización clínica de las nuevas fluoroquinolonas, abre un interrogante sobre el mantenimiento de esta eficacia, tanto frente a *H. influenzae* como frente a otros patógenos inicialmente sensibles a las mismas.

Rifampicina, tetraciclina y cloranfenicol, habitualmente estudiados en todas las series referidas a la sensibilidad de *H. influenzae*, mantienen una buena actividad en este estudio, no encontrándose ninguna cepa resistente a cloranfenicol y solamente en 3 de ellas las CIM del antimicrobiano fueron de 2 mg/l.

En resumen, las cepas de *H. influenzae* aisladas recientemente parecen seguir manteniendo un espectro de sensibilidad no muy distinto al de 10 años atrás, permitiendo la utilización de variados agentes antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo, al menos en España. La puesta en marcha de estudios periódicos de sensibilidad constituye una práctica obligada en el panorama de la vigilancia epidemiológica de estas infecciones.

## Bibliografía

- Moxon ER. *Haemophilus influenzae*. En: Mandell GL, Douglas, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995; p. 2039-45.
- Campos JM. *Haemophilus*. En: Murray JM, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington: ASM Press, 1995; p. 556-65.
- Tomah M, Starr SE, McGowan JE, Terry PM, Nahmias AJ. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b infection. JAMA 1974;229:295-7.
- Gunn BA, Woodall JB, Jones JF, Thornsberry C. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Lancet 1974;2:845.
- Khan W, Starr SE, Rodríguez W, Controni G, Sa AK. *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin: A report of two cases. JAMA 1974;229: 298-301.
- Perea EJ, García MC, Clavijo MJ, Piédrola G, Campos J, García-Rodríguez JA, et al. Resistencias en *Haemophilus influenzae* en España. Segundo estudio (1990). Enferm Infecc Microbiol Clin 1993;11:19-28.
- Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP Jr, Rauch A. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of  $\beta$ -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavunate: Results of a national multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:292-7.
- Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, Kugler K, and The SENTRY Participants Group. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: Antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). Antimicrob Agents Chemother 1999;43:385-9.
- Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley HP Jr, Sahm DF. Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2612-23.
- Marco F, García de Lomas J, García-Rey C, Bouza E, Aguilar L, Fernández-Mazarrasa C. Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3226-8.
- Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1693-9.
- Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pellissier R, Faucon G, Bennamouni S, et al. Protein diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2208-18.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically (Fifth Edition M7-A4: Supplemental tables M100-S10. NCCLS 2000; Villanova, PA.
- Rubin LG, Yolken RH, Medeiros AA, Moxon ER. Ampicillin treatment failure of apparently  $\beta$ -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel  $\beta$ -lactamase. Lancet 1981;2:1008-10.
- Scriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, et al, and Canadian *Haemophilus* Study Group, Low DE. Determination of antimicrobial susceptibility of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1678-80.
- Machka K, Braveny I, Dabernet H, Dornbush K, Van Dyck E, Kayser FH, et al. Distribution and resistance patterns of *Haemophilus influenzae*: A European cooperative study. Europ J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:14-24.
- Kayser FH, Morensoni G, Santanam P. The second European collaborative study on the frequency of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Europ J Clin Microbiol Infect Dis 1990;9:810-7.
- Rittenhouse SF, Miller LA, Kaplan RL, Mosely GH, Poupard JA. A survey of  $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. Diagnost Microbiol Infect Dis 1995;21:223-5.
- García de Lomas J, Grupo Español para Vigilancia de Patógenos Respiratorios. Situación epidemiológica actual y resistencia de los patógenos respiratorios en España. Med Clin (Barc) 1998;110(Supl 1):S44-S51.
- Black SB, Shinefield HR, The Kaiser Permanente Vaccine Study Group. Immunization with oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine on a large HMO population: Extended follow-up and impact on *Haemophilus influenzae* disease epidemiology. Ped Infect Dis J 1992;11:610-3.
- Karlowsky JA, Verma G, Zhanel GG, Hoban DJ. Presence of ROB-1  $\beta$ -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 2000;45:871-5.
- Okamoto S, Hamana Y, Inoue M, Mitsuhashi S. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-2588, a new oral cephalosporin, compared with those of other oral  $\beta$ -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1987;3:1111-6.