ARTICULO ORIGINAL

Susceptibilidad in vitro de patógenos respiratorios a levofloxacin y otros antimicrobianos

M. SOLEDAD GIGLIO M.^{1,2}, LORENA PORTE T.¹, BEATRICE HERVE E.³ y M. TERESA ULLOA F.¹

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF RESPIRATORY PATHOGENS TO LEVOFLOXACIN AND OTHER ANTIBIOTIC AGENTS

*The increasing resistance of the microorganisms involved in the upper and lower respiratory tract infections demands the continuous evaluation of new agents against these pathogens. Quinolones have been shown to be effective in a variety of infections but not on the respiratory tract. Levofloxacin, levoisomeric of ofloxacin (l-ofloxacin) which has been recently approved for respiratory infection treatment, has demonstrated in other countries, a wide range in vitro activity against gram positive and gram negative microorganisms with MIC which vary from 0.03 to 2 µg/ml. With these antecedents the in vitro susceptibility to levofloxacin and other antimicrobial agents used in the respiratory tract infections was evaluated against microorganisms isolated in the western area of Santiago. The study included 181 strains (76 **Streptococcus pneumoniae**, 22 **Moraxella catarrhalis**, 46 **Haemophilus influenzae** and 37 beta hemolytic **Streptococci**), which were tested by the agar dilution method with concentrations within a range of 0.008 µg/ml to 16 µg/ml of levofloxacin, penicillin, erythromycin, cefotaxime, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, sulpha/trimethoprim, chloramphenicol and ciprofloxacin. Results: strains of **S. pneumoniae** that were susceptible to penicillin were 100% susceptible to cefotaxime and levofloxacin, 75% to ciprofloxacin and 97.5% to erythromycin. The ones that showed intermediate resistance to penicillin were 100% susceptible to levofloxacin, 85.7% to erythromycin, 80% to ciprofloxacin and 94.5% to cefotaxime. The resistant strains showed a similar pattern to the intermediate ones. **H. influenzae** strains were resistant to chloramphenicol in 18.2% and to ampicillin in 15.2%, and were susceptible in 100% of cases to the quinolones studied. **M. catarrhalis** was resistant to ampicillin in 100% and susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and levofloxacin in 100% of cases. We conclude that the microorganisms responsible of respiratory infections have a variable susceptibility pattern to*

¹ Universidad de Chile, Programa de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas ICBM, Facultad de Medicina.

² Aventis (lugar de trabajo actual).

³ Laboratorio de Microbiología Hospital San Juan de Dios.

commonly used antimicrobial agents and levofloxacin could be an alternative therapy.

Key words: *In vitro* activity; *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; *Moraxella catarrhalis*; Levofloxacin.

Los microorganismos involucrados en infecciones del tracto respiratorio bajo y alto, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* y *Moraxella catarrhalis*, han adquirido resistencia a los antimicrobianos de uso habitual en estas infecciones tanto en el contexto mundial como nacional.

Para algunos de los antimicrobianos de elección como penicilina, se ha observado la aparición de un alto grado de resistencia en cepas de *S. pneumoniae*, que fluctúa entre 10 y 54%. En el caso de eritromicina, ésta es del orden de 3 a 10% en cepas de *S. pneumoniae* susceptibles a penicilina y 30 a 40% en cepas resistentes a penicilina.¹ En nuestro país, se ha informado una resistencia global a penicilina de 22,7% en 1987² y alrededor de 31% hasta 1998 con un 11% de resistencia de alto nivel.^{3,4} También ha aumentado la resistencia de *H. influenzae* a ampicilina, cloranfenicol y cotrimoxazol con tasas de 10 a 40%.¹ La susceptibilidad de *M. catarrhalis* ha variado desde los años 70 ya que, siendo inicialmente un microorganismo no productor de β -lactamasa, hoy en día alrededor del 90% de las cepas sí la producen.⁵ Este incremento de la emergencia de cepas resistentes demanda la evaluación de nuevos agentes con actividad contra estos patógenos.

Se ha demostrado la efectividad de las quinolonas en una variedad de enfermedades infecciosas, no así en el tracto respiratorio. Levofloxacin, levoisómero de ofloxacin (l-ofloxacin), recientemente aprobado para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio tales como sinusitis aguda, exacerbación aguda de bronquitis crónica y neumonía adquirida en la comunidad, ha demostrado en otros países una amplia actividad *in vitro* contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos con CIMs que varían entre 0,03 y 2 μ g/ml en los agentes respiratorios más frecuentes. Debido a la importancia de contar con

datos locales, se evaluó la actividad de levofloxacin y de otros antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de infecciones respiratorias, sobre diferentes microorganismos aislados de pacientes consultantes en el área Occidente de Santiago.

MATERIAL Y METODO

Se evaluaron 181 cepas de microorganismos aislados en el Hospital San Juan de Dios, provenientes de muestras del tracto respiratorio (nasofaríngea, expectoración, lavado bronco-alveolar, secreción ótica) y sangre, entre 1995 y 1997, tanto de pacientes ambulatorios como hospitalizados con infecciones respiratorias. De ellas, 76 fueron cepas de *S. pneumoniae* (40 cepas sensibles a penicilina, 21 con resistencia intermedia y 15 cepas con alta resistencia), 37 *Streptococcus* β hemolíticos (28 *S. pyogenes* y 9 *Streptococcus* β hemolíticos spp), 22 cepas de *M. catarrhalis* y 46 cepas de *H. influenzae*. Se determinó la CIM por método de dilución en agar recomendado por NCCLS 1998 para cada uno de ellos, utilizando agar Muller Hinton (BBL) más 5% sangre de cordero para *Streptococcus* y *Moraxella*, y *Haemophilus Test Medium* (Oxoid) para *H. influenzae*. Los antimicrobianos estudiados en concentraciones de 0,008 -16 μ g/ml fueron levofloxacin y cefotaxima (Hoechst Marion Roussel), eritromicina (Sigma), ciprofloxacina (Bayer), penicilina, ampicilina, cotrimoxazol y cloranfenicol (Laboratorio Chile) y cefuroxima (Glaxo Wellcome). Para determinar la CIM de amoxicilina/ácido clavulánico se utilizó el método dilución-difusión, (E test[®]): Las cepas se mantuvieron congeladas a -70°C. Los puntos de corte se compararon con las tablas NCCLS 1998.⁶ Se utilizaron como control las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, *S. pneumoniae* ATCC 49619 y *Haemophilus influenzae* ATCC 49247. La detección de β lactamasa se realizó mediante el método de nitrocefinaasa BBL[®].

Tabla 1. Distribución de 181 cepas según tipo de muestra

Tipo de muestra	<i>S. pneumoniae</i> (n = 76)	<i>S. pyogenes</i> y <i>S. β</i> hemolítico spp (n: 37)	<i>H. influenzae</i> (n = 46)	<i>M. catarrhalis</i> (n = 22)	Total 181
Expectoración	15	-	20	13	48
L.B.A*	3	-	1	2	6
L. pleural	7	-	4	-	11
Sangre	20	-	2	-	22
S faríngea	-	37	-	-	37
S. parotídea	4	-	2	2	8
S. nasal	14	-	6	2	22
S. ótica	2	-	2	2	6
S. ocular	5	-	8	1	14
Otros*	6	-	1	-	7

* Lavado broncoalveolar, Otros: líquido cefalorraquídeo, peritoneal.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa la distribución de las cepas estudiadas según tipo de muestra.

De las cepas de *S. pneumoniae* sensibles a penicilina (n: 40) 2,5% presentaron resistencia

a eritromicina, 25% a ciprofloxacina y 0% a cefotaxima. Las cepas de *S. pneumoniae* con resistencia intermedia a penicilina (n: 21) mostraron 14,3% de resistencia a eritromicina, 5,5% a cefotaxima y 20% a ciprofloxacina. Las cepas de *S. pneumoniae* con resistencia de

Tabla 2. Susceptibilidad de 76 cepas de *Streptococcus pneumoniae* a diversos antimicrobianos

		<i>S. pneumoniae</i> sensibles a penicilina		
Antimicrobiano		% susceptibilidad	Rango µg/ml	CIM ₅₀ - CIM ₉₀
Eritromicina	(n: 40)	97,5	≤ 0,03 - 4	0,06 - 0,125
Cefotaxima	(n: 34)	100	≤ 0,03 - 0,125	≤ 0,03 - 0,06
Ciprofloxacina	(n: 30)	75	0,25 - 4	1 - 2
Levofloxacina	(n: 40)	100	≤ 0,03 - 1	1 - 1
		<i>S. pneumoniae</i> con resistencia intermedia a penicilina		
Antimicrobiano		% susceptibilidad	Rango µg/ml	CIM ₅₀ - CIM ₉₀
Eritromicina	(n: 21)	85,7	≤ 0,03 - 1	0,06 - 0,125
Cefotaxima	(n: 18)	94,5	0,06 - 1	0,125 - 0,5
Ciprofloxacina	(n: 16)	80	0,25 - 2	0,5 - 1
Levofloxacina	(n: 21)	100	0,5 - 2	1 - 1
		<i>S. pneumoniae</i> resistentes a penicilina		
Antimicrobiano		% susceptibilidad	Rango µg/ml	CIM ₅₀ - CIM ₉₀
Eritromicina	(n: 15)	80	≤ 0,03 - > 16	0,06 - 4
Cefotaxima	(n: 15)	86,7	0,06 - 2	1 - 2
Ciprofloxacina	(n: 15)	77	0,5 - 2	0,5 - 2
Levofloxacina	(n: 15)	100	0,5 - 2	0,5 - 1

Tabla 3. Susceptibilidad de 46 cepas de *H. influenzae* a diversos antimicrobianos

Antimicrobiano	% susceptibilidad	Rango µg/ml	CIM ₅₀ - CIM ₉₀
Ampicilina	71,7	≤ 0,5 - ≥ 16	≤ 0,5 - 2
Cefuroxima	97,8	≤ 0,25 - 8	≤ 0,25 - 4
Cefotaxima	100	≤ 0,125 - 0,5	≤ 0,125 - ≤ 0,125
Cloranfenicol	91,3	≤ 0,25 - 16	≤ 0,5 - 4
Ciprofloxacina	100	≤ 0,03 - 0,5	0,03 - 0,03
Levofloxacina (n: 43)	100	≤ 0,0035 - 0,125	0,007 - 0,007

Tabla 4. Susceptibilidad de 37 cepas de *Streptococcus β* hemolíticos a diversos antimicrobianos

Antimicrobiano	% susceptibilidad	Rango µg/ml	CIM ₅₀ - CIM ₉₀
Eritromicina	94,6	≤ 0,03 - 2	0,06 - 0,12
Penicilina	100	≤ 0,007 - 0,125	0,03 - 0,03
Levofloxacina	100	≤ 0,03 - 1	0,5 - 1

Tabla 5. Susceptibilidad de 22 cepas de *Moraxella catarrhalis* a diversos antimicrobianos

Antimicrobiano	% susceptibilidad	Rango µg/ml	CIM ₅₀ - CIM ₉₀
Ampicilina *	0		
Amoxicilina/ácido clavulánico	100	≤ 0,016 - 0,75	0,125 - 0,5
Eritromicina	95,5	0,125 - 1	0,25 - 0,5
Levofloxacina	100	≤ 0,03 - 1	≤ 0,03 - 0,06

* Detectada por nitrocefinasa

alto nivel a penicilina (n: 15) presentaron 20% de resistencia a eritromicina, 23% a ciprofloxacina y 13,3% a cefotaxima (Tabla 2).

H. influenzae (n: 46) presentó una resistencia de 28,3 y 8,7% a ampicilina y cloranfenicol respectivamente y sólo 2,2% de resistencia a cefuroxima (Tabla 3).

Los estreptococos *β* hemolíticos *spp* (n: 37) presentaron 5,4% de resistencia a eritromicina y 0% a penicilina. (Tabla 4).

No hubo resistencia de *M. catarrhalis* (n:

22) a amoxicilina/ácido clavulánico pero 100% fueron resistentes a ampicilina, siendo todas productoras de β lactamasa (Tabla 5).

Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a levofloxacina (Tablas 2-5).

DISCUSION

S. pneumoniae es la primera causa de infecciones del tracto respiratorio seguido por *H. influenzae*, especialmente en pacientes adultos

con patología respiratoria crónica. En estas dos especies ha surgido la problemática de la resistencia como se ha demostrado mundialmente y en nuestro país, presentando mecanismos de resistencia diferentes.¹

El mecanismo de resistencia de *S. pneumoniae* a penicilina es la alteración de las proteínas ligadoras de penicilina. Esta realidad ha llevado a reducir el uso de penicilina especialmente para el tratamiento de infecciones en que la concentración de este antimicrobiano es menor y su actividad clínica pudiera ser menos efectiva (otitis media y meningitis). Es importante agregar que en las cepas de *S. pneumoniae* se observó simultáneamente resistencia a cefotaxima y macrólidos en cepas que son resistentes y moderadamente sensibles a penicilina, coincidiendo estos datos con los obtenidos en reportes nacionales e internacionales.^{2-4, 8} En EE.UU. y Europa^{8, 9} se ha descrito hasta 50% de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina, fenómeno detectado en este estudio pero no con tan alta frecuencia. La resistencia a eritromicina resulta de la expresión del gen denominado *erm*, el cual codifica la enzima adenina dimetilasa que actúa en la porción 23S del ARN ribosomal resultando en una afinidad reducida a la eritromicina. Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia a eritromicina, relacionado con una bomba de eflujo codificada por el gen *mef*.¹⁰

Cabe señalar que no existen puntos de corte descritos por la NCCLS para ciprofloxacina, por lo tanto, se consideraron los puntos de corte utilizados por Thomson et al. ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$ como punto de corte para las cepas sensibles). Estos autores reportaron 61% de susceptibilidad⁸ y Casellas, 50%.¹⁶ En nuestro estudio la resistencia a ciprofloxacina (alrededor de 20%) fue independiente de su comportamiento a la penicilina. *S. pneumoniae* no presentó resistencia a levofloxacin y la CIM₉₀, tanto en las cepas sensibles como de resistencia intermedia y de alto nivel a penicilina, fue de $1 \mu\text{g/ml}$. Esto coincide con trabajos publicados y/o presentados en Europa, EE.UU. y Latinoamérica.¹¹⁻¹⁴

El mecanismo de resistencia más importante

para *H. influenzae* y *M. catarrhalis* es la producción de β lactamasa que disminuye la posibilidad de utilizar ampicilina.¹ En este estudio se reporta una resistencia en *H. influenzae* de 28,3% a ampicilina y 8,7% a cloranfenicol y un 2,2% de resistencia a cefuroxima, no existiendo resistencia a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico. Esto es concordante con los estudios de Thornsberry⁹ y Derecola,¹⁵ cuyos resultados demuestran una resistencia de aproximadamente 30% a ampicilina, mejorando la actividad *in vitro* con la asociación de amoxicilina/ácido clavulánico.

Todas las cepas fueron sensibles a ciprofloxacina y levofloxacin siendo las CIMs para esta última dos veces más bajas.

La resistencia de *M. catarrhalis* a ampicilina alcanzó a 100% por detección de β lactamasa, todas las cepas fueron productoras de la enzima. La susceptibilidad fue de 100% a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico, hecho explicable por la efectividad del ácido clavulánico para inhibir la acción de las β lactamasas. Al igual que en el caso anterior, todas las cepas fueron sensibles a levofloxacin, lo que coincide con estudios realizados en otros países.¹⁶

Al analizar *Streptococcus* β hemolíticos, se confirmó que estos agentes mantienen su susceptibilidad a penicilina.¹⁷ En cambio, se observó un aumento incipiente de la resistencia a eritromicina. Camponovo et al comunicaron recientemente 13,5% de resistencia en nuestro país lo que pudiera estar relacionado con el uso cada vez más significativo de eritromicina en las infecciones respiratorias bajas y altas.¹⁸ En países como Japón la resistencia ha llegado a 20%, sin mediar resistencia a penicilina.¹

Nuestros resultados indican que los microorganismos productores de infecciones del tracto respiratorio presentan sensibilidad variable frente a los antimicrobianos de uso habitual. Por esta razón levofloxacin, antimicrobiano al cual todas las cepas fueron sensibles, constituye una alternativa a considerar, principalmente frente a patógenos respiratorios adquiridos en la comunidad, en patologías infecciosas tales como sinusitis, neumonía y bronquitis crónica.

RESUMEN

El incremento de resistencia antimicrobiana en los agentes etiológicos de infecciones respiratorias altas y bajas demanda la evaluación continua de nuevos agentes con actividad contra estos patógenos. Las quinolonas son efectivas en una variedad de enfermedades infecciosas no así en el tracto respiratorio. Levofloxacina, levoisómero de ofloxacina (l-ofloxacin), recientemente aprobada para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, ha demostrado en otros países una amplia actividad *in vitro* contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos con CIMs que varían de 0,03 a 2 µg/ml en los agentes respiratorios más frecuentes. Con estos antecedentes se evaluó la susceptibilidad *in vitro* a levofloxacina y otros antimicrobianos empleados en el tratamiento de infecciones respiratorias, de microorganismos aislados en estas patologías en el área Occidente de Santiago. **Material y Método.** Se estudió la sensibilidad *in vitro* de 181 cepas obtenidas de pacientes con infecciones respiratorias, (76 *Streptococcus pneumoniae*, 22 *Moraxella catarrhalis*, 46 *Haemophilus influenzae* y 37 *Streptococcus* β hemolíticos spp), por método de dilución en agar en concentraciones de 0,008-16 µg/ml para levofloxacina, penicilina, eritromicina, cefotaxima, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cotrimoxazol, ciprofloxacina y cloranfenicol. **Resultados.** *S. pneumoniae*: las cepas sensibles a penicilina fueron 100% sensibles a cefotaxima y levofloxacina, 75% a ciprofloxacina y 97,5% a eritromicina. Las cepas de resistencia intermedia fueron 100% sensibles a levofloxacina, 85,7% a eritromicina, 80% a ciprofloxacina y 94,5% a cefotaxima. Las cepas resistentes fueron similares a las de resistencia intermedia. *H. influenzae*: presentó una resistencia de 28,3% para ampicilina, 8,7% para cloranfenicol y 100% de susceptibilidad a quinolonas. *M. catarrhalis*: fue 100% resistente a ampicilina y 100% sensible a amoxicilina/ácido clavulánico y levofloxacina. **Conclusiones.** Los resultados indican que los microorganismos productores de infecciones del tracto respiratorio presentan sensibilidad variable para los antimicrobianos de uso habitual

y que levofloxacina podría ser una alternativa en su terapia.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BAQUERO F, BARRETT J F, COURVALIN P, MORRISEY I, PIDDOCK I, NOVICK. Epidemiology and mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens Clin Microbiol Infect 1998; 4: 19-26.
- 2.- JULIET C, GIGLIO M S, CAMPONOVO R. Sensibilidad de *S. pneumoniae* y su importancia clínica. Rev Méd Chile 1987; 115: 852-7.
- 3.- GIGLIO M S, CAMPONOVO R, PINTO C ME. Sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y otros antimicrobianos Libro de Resúmenes, VI Congreso Panamericano de Infectología y X Congreso Chileno de Infectología, Mayo 1993 Viña del Mar, Chile.
- 4.- PALAVECINO E, CAMPONOVO R, GIGLIO M S, APPELBAUM P, JACOBS M. Alta prevalencia de *S. pneumoniae* resistente a antibióticos. Libro de Resúmenes, XV Congreso Chileno de Infectología, Agosto 1998, Santiago Chile.
- 5.- BERK S L, KALBFLEISCH J H. The Alexander Project Collaborative Group. Antibiotic susceptibility patterns of community-acquired respiratory isolates of *Moraxella catarrhalis* in Western Europe and in the USA. J. Antimicrob Chemother 1996; 38 (Suppl A): 85-96.
- 6.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 8th ed. Approved Standard NCCLS Document M100-S(8) Wayne, PA, 1998.
- 7.- GOLSDTEIN F, BRYSKIER A, APPELBAUM P C et al. The etiology of respiratory tract infections and the antibacterial activity of fluorquinolones and other oral antibacterial agents against respiratory pathogens. Clin Microbiol Infect 1998; 4: 8-18.
- 8.- THOMSOM K S, CHARTRAND S A, SANDERS C C, BLOCK S L. *In vitro* activity of levofloxacin against antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Abstracts of 20 International Congress of Chemotherapy, P018, Sydney 1997.
- 9.- THORNSBERRY C, OGILVIE P, KAHN J, MAURIZ Y. Surveillance of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the United States in 1996-1997 respiratory season. The Laboratory Investigator Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29: 249-57.
- 10.- PALAVECINO E, APPELBAUM P, JACOBS M. *Streptococcus pneumoniae* resistente a antibióticos: Aspectos microbiológicos y clínicos. Rev Chil Infect 1997; 14: 7-27.
- 11.- BIEDENBACH D J, JONES R N. The comparative antimicrobial activity of levofloxacin tested against 350 clinical isolates of Streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 25: 47-51.

- 12.- HOOGKRAMP-KORSTANJE J A A. *In vitro* activities of ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, pefloxacin, sparfloxacin and trovafloxacin against Gram-positive and Gram-negative pathogens from respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 427-31.
- 13.- MORRISSEY G J. The bactericidal activity of levofloxacin compared with ofloxacin, D-ofloxacin, ciprofloxacin, sparfloxacin and cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 719-23.
- 14.- CASELLAS J M, TOME G, FARINATI A E, GILARDONI M, PAGNIEZ G, IVANOVIC S. *In vitro* activities of levofloxacin, trovafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and sparfloxacin against 118 isolates from adults community acquired lower respiratory tract infections with reduced susceptibility to commonly used antibiotics. 8th International Congress on Infectious Diseases, Boston 1998.
- 15.- DERECOLA A, BUTLER D L, KAPLAN R L, MILLER L A, POUPARD J A. A 5-year surveillance study of 44,691 isolates of *Haemophilus influenzae* project Beta-Alert 1993-1997. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 185-6.
- 16.- CASELLAS J M, GILARDONI M, TOME G et al. Comparative in- vitro activity of levofloxacin against isolates of bacteria from adult patients with community- acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrobial Chemother* 1999; 43 (Suppl): S37-42.
- 17.- Boletín de Vigilancia Epidemiológica de sensibilidad antimicrobiana de algunos agentes bacterianos de importancia clínica. Instituto de Salud Pública, 1997.
- 18.- CAMPONOVO R, SEPULVEDA A, FIGUEROA O, HEITMANN I. Resistencia a eritromicina de *Streptococcus pyogenes*. Libro de Resúmenes, XV Congreso Chileno de Infectología, Agosto 1998 Santiago, Chile.

Correspondencia a:

M. Soledad Giglio Maira

Nivaldo Correa 833, Código Postal Las Condes, Santiago

Email: marisol.giglio@aventis.com