

## Original

# Sensibilidad de *Campylobacter jejuni* a ocho antibióticos en cepas aisladas de muestras clínicas de niños

J.A. García-Campos<sup>1</sup>, T. Alarcón<sup>1</sup>, D. Domingo<sup>1</sup>, M. Menéndez-Rivas<sup>2</sup> y M. López-Brea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de La Princesa, c/ Diego de León nº 62, 28006 Madrid;

<sup>2</sup>Hospital Infantil del Niño Jesús, Madrid

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue conocer la sensibilidad de *Campylobacter jejuni* a ocho antimicrobianos. Se estudió la sensibilidad de 80 cepas aisladas de heces diarreicas de niños a los siguientes antibióticos: ofloxacino, moxifloxacino, azitromicina, eritromicina, clindamicina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y tetraciclina. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron mediante un método de dilución en agar, considerando resistencia a azitromicina y eritromicina cuando la CMI  $\geq 8$  mg/l, a clindamicina si la CMI  $\geq 1$  mg/l, a amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina si la CMI  $\geq 32$  mg/l, a ofloxacino y moxifloxacino si la CMI  $\geq 4$  mg/l y a tetraciclina si la CMI  $\geq 16$  mg/l. Todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico. Las tasas de resistencia más bajas las presentaron azitromicina, eritromicina, clindamicina y ampicilina, siendo del 2%, 3,7%, 4,4% y 4,9% respectivamente, y las más altas ofloxacino, tetraciclina y moxifloxacino, con resistencias del 61,7% para los dos primeros y del 37% para el tercero. Los macrólidos probados, grupo de antibióticos de elección en el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo, presentaron una excelente actividad, con una CMI<sub>90</sub> de 0,5 mg/l para la azitromicina y 2 mg/l para la eritromicina.

**Palabras clave:** *Campylobacter jejuni* - Sensibilidad - Niños

## Susceptibility of *Campylobacter jejuni* clinical isolates from children to eight antibiotics

### SUMMARY

This study aimed to identify the activity of eight antibiotics (ofloxacin, moxifloxacin, azithromycin, erythromycin, clindamycin, ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid and tetracycline) against 80 strains of *Campylobacter jejuni* isolated from children. Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined by an agar dilution method. Resistance to azithromycin and erythromycin was considered when MIC  $\geq 8$  mg/l, to clindamycin when MIC  $\geq 1$  mg/l, to amoxicillin-clavulanic acid and ampicillin when MIC  $\geq 32$  mg/l, to ofloxacin and moxifloxacin when MIC  $\geq 4$  mg/l, and to tetracycline when MIC  $\geq 16$  mg/l. All strains tested were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid. The lowest frequency of resistance was to azithromycin (2%), erythromycin (3.7%), clindamycin (4.4%) and ampicillin (4.9%), and the highest was to ofloxacin and tetracycline (61.7% for both), and moxifloxacin (37%). Considered the antibiotics of choice for the treatment of infections caused by this microorganism, macrolides showed excellent activity with MIC<sub>90</sub> = 0.5 mg/l for azithromycin and MIC<sub>90</sub> = 0.5 mg/l for erythromycin.

**Key words:** *Campylobacter jejuni* - Susceptibility - Children

## INTRODUCCIÓN

*Campylobacter* spp. es uno de los patógenos bacterianos causantes de infección gastrointestinal más frecuentes. Algunos estudios lo señalan como el más frecuente (1, 2) y otros lo sitúan detrás de *Salmonella* spp. (3-6). Parece clara la distribución estacional de la infección por *Campylobacter* spp. (7), con distintos patrones según las zonas (8). La especie más frecuente es *Campylobacter jejuni*, que representa cerca del 90% de las infecciones por *Campylobacter* spp., seguido por *Campylobacter coli*, que representa un 3% a 7% (9).

Para su identificación inicial basta con realizar una tinción de Gram de las colonias con morfología sugestiva que crezcan en medio selectivo para *Campylobacter* incubado a 42 °C en condiciones de microaerofilia y observar bacilos gramnegativos curvados, que den positivo en la prueba de la oxidasa (10). Con ello puede establecerse una identificación presuntiva de *Campylobacter* spp. La prueba positiva de la hidrólisis del hipurato nos indicará que nos encontramos ante *C. jejuni* sin necesidad de realizar más pruebas bioquímicas. Sin embargo, la identificación específica de *Campylobacter* según las diferencias en el fenotipo bioquímico es complicada puesto que las pruebas bioquímicas que se pueden realizar aportan poca información, y no hay que olvidar que entre un 5% y un 10% de las cepas de *C. jejuni* son hipurato-negativas (9). Por todo ello se están desarrollando diferentes métodos moleculares para su identificación (11-14). Puesto que los métodos de aislamiento usados habitualmente requieren la incubación a 42 °C, puede ser que las campilobacteriosis por especies no estrictamente termofílicas estén subestimadas, ya que el crecimiento de estas especies se inhibe a dicha temperatura (15).

Las manifestaciones clínicas de todas las especies de *Campylobacter* que producen enfermedades diarreicas parecen idénticas, y en general las campilobacteriosis suelen ser procesos leves autolimitados. Pero a pesar de ello es necesario conocer la sensibilidad antibiótica de estos enteropatógenos para poder tratar correctamente los casos graves (16), sobre todo considerando que la resistencia antibiótica de las cepas de *Campylobacter* spp. es un problema en aumento. De sobra es conocido el espectacular incremento de la resistencia a las quinolonas durante la década de 1990 (17, 18), lo cual hizo que los macrólidos pasasen a ser considerados como el tratamiento de elección.

El objetivo del presente estudio fue determinar la sensibilidad a ocho agentes antimicrobianos de las cepas de *C. jejuni* aisladas de heces diarreicas de niños.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se estudiaron 80 cepas de *C. jejuni* aisladas de heces diarreicas de niños atendidos en el Hospital Infantil del Niño Jesús (Madrid). Para su aislamiento, las muestras clínicas fueron sembradas en medio selectivo para *Campylobacter* (*Campyloselect-agar*, BioMérieux) e incubadas en jarra con atmósfera microaerofílica (*GENbox*, BioMérieux) a 42 °C. A las colonias que crecían se les realizaba una tinción de Gram y las pruebas de la catalasa y la oxidasa para la identificación del género. Además, se realizaba la prueba de hidrólisis del hipurato para la identificación de la especie (*C. jejuni*). Los aislamientos así identificados se conservaron a -80 °C en caldo tripticasa-soja con un 15% de glicerol hasta su posterior estudio.

### Antibióticos

Los antibióticos probados fueron ofloxacino, moxifloxacino, azitromicina, eritromicina, clindamicina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina y tetraciclina, y se obtuvieron de sus diferentes fabricantes como preparados para uso en laboratorio de potencias definidas, usando los solventes y diluyentes recomendados por el NCCLS (19).

### Prueba de sensibilidad antibiótica

Se determinó la CMI de los ocho antibióticos en cada aislamiento clínico de *Campylobacter* spp. por el procedimiento de dilución en agar usando diluciones dobles seriadas (0,06 a 128 mg/l) en agar Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de caballo. Para ello las cepas se descongelaron, se subcultivaron en agar sangre y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Las colonias que crecieron fueron nuevamente identificadas.

El inóculo se preparó en caldo de cerebro-corazón, a partir de un cultivo de 24 horas hasta alcanzar una densidad óptica estándar de 0,5 McFarland. El inóculo final, que se aplicó con un replicador automático de Steers, fue de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por gota. La CMI se leyó a las 48 y a las 72 horas de incubación en atmósfera microaerofílica a 37 °C. La CMI se definió como la concentración más baja en la cual no se apreciaba crecimiento. No existe una recomendación oficial de puntos de corte para *Campylobacter* spp. y consideramos los detallados en la Tabla 1 atendiendo a nuestra propia experiencia y a la revisión de la literatura. Como control se usó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, teniendo en cuenta las consideraciones necesarias para la lectura de sus CMI en un estudio de sensibilidad de cepas de *Campylobacter* spp.

**Tabla 1. Puntos de corte utilizados para definir las cepas como resistentes.**

Antibiótico	Punto de corte (mg/l)
Ofloxacino	CMI $\geq$ 4
Moxifloxacino	CMI $\geq$ 4
Azitromicina	CMI $\geq$ 8
Eritromicina	CMI $\geq$ 8
Clindamicina	CMI $\geq$ 1
Ampicilina	CMI $\geq$ 32
Amoxicilina-ácido clavulánico	CMI $\geq$ 32
Tetraciclina	CMI $\geq$ 16

(20). El inóculo final fue de  $10^4$  UFC por gota (se inoculó una dilución 1:10).

## RESULTADOS

Los resultados de sensibilidad, expresados como la CMI que inhibe el 50% (CMI<sub>50</sub>) o el 90% de las cepas (CMI<sub>90</sub>), el intervalo de CMI y el porcentaje de resistencia, pueden observarse en la Tabla 2.

Respecto a las quinolonas estudiadas, ofloxacino y moxifloxacino, el porcentaje de resistencia fue del 61,7% y el 37%, respectivamente. Fue mayor la actividad antibiótica de moxifloxacino (CMI<sub>90</sub>=8 mg/l) que la de ofloxacino (CMI<sub>90</sub>=32 mg/l).

La resistencia a los macrólidos estudiados, azitromicina y eritromicina, es bastante similar para ambos: del 2,5% y el 3,7%, respectivamente. Sin embargo, es mayor la actividad antibiótica de la azitromicina (CMI<sub>90</sub>=0,5 mg/l) que la de la eritromicina (CMI<sub>90</sub>=2 mg/l).

El antibiótico que presentó una menor actividad fue la tetraciclina, con una CMI<sub>90</sub>>128 mg/l y una tasa de resistencia del 61,7%.

**Tabla 2. Resultados de sensibilidad a los ocho antimicrobianos estudiados en las 80 cepas de *C. jejuni*.**

Antibiótico	CMI <sub>50</sub> (mg/l)	CMI <sub>90</sub> (mg/l)	Intervalo (mg/l)	Resistencia (%)
Ofloxacino	4	32	<0,06->128	61,7
Moxifloxacino	2	8	$\leq$ 0,06-16	37
Azitromicina	0,25	0,5	$\leq$ 0,06-16	2
Eritromicina	0,5	2	$\leq$ 0,06-8	3,7
Clindamicina	0,25	4	$\leq$ 0,06-4	4,4
Ampicilina	2	8	$\leq$ 0,06->128	4,9
Amoxicilina- ácido clavulánico	0,5	2	$\leq$ 0,06-4	0
Tetraciclina	32	>128	$\leq$ 0,06->128	61,7

Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico.

## DISCUSIÓN

Cada vez son más necesarios los estudios referentes a la sensibilidad antibiótica de aislamientos clínicos de enteropatógenos pertenecientes al género *Campylobacter*, pues el número de ingresos hospitalarios por salmonelosis y campilobacteriosis en nuestro medio se está igualando (21) y por la necesidad de evitar las consecuencias indeseables del tratamiento de las infecciones gastrointestinales por *Campylobacter* con un antibiótico al que sea resistente (22). En este trabajo nos hemos centrado en *C. jejuni*, la especie más frecuentemente aislada.

El estudio que presentamos, realizado sobre aislamientos de muestras clínicas procedentes de niños, refleja una alta tasa de resistencia de *C. jejuni* a las quinolonas, del 61,7% al ofloxacino y del 37% al moxifloxacino. Estos datos concuerdan con los resultados de otros estudios realizados en España (23, 24), aunque éstos no se centraban en pacientes pediátricos. En nuestro estudio hemos encontrado diferencias entre la sensibilidad al moxifloxacino y al ofloxacino. Fue mayor la resistencia al ofloxacino (61,7%) que al moxifloxacino (37%), lo cual era esperable por ser moxifloxacino una quinolona de generación posterior, pero esta diferencia no fue encontrada por Fernández-Roblas y cols. (24). Es de destacar que en un estudio realizado en Chile (25) la sensibilidad fue del 100% en los aislamientos de *C. jejuni*, con una CMI<sub>90</sub>  $\leq$ 0,125 mg/l.

La baja tasa de resistencia que hemos observado en los macrólidos, tratamiento de elección, confirma lo encontrado en otros estudios. Los que han sido realizados en España encuentran desde un 1,1% a un 3,2% de resistencia (23, 24, 26). Los datos de estudios en otros países son similares a los nuestros (25, 27). El hecho de que en este estudio la azitromicina tenga mejor actividad que la eritromicina (CMI<sub>90</sub>=0,5 mg/l frente a CMI<sub>90</sub>=2 mg/l) confirma datos comunicados anteriormente (28, 29).

La clindamicina, antibiótico perteneciente al grupo de las lincosamidas, con propiedades biológicas muy similares a las de los macrólidos, presenta al igual que éstos una baja tasa de resistencia (4,4%), lo cual también confirma los resultados de otros estudios (23, 26).

En cuanto a la tasa de resistencia a la ampicilina, del 4,9%, es más baja que la referida en distintos trabajos, tanto en España (23, 26, 30), que presentan tasas del 18,3%, 38% y 51,8%, como en Canadá, donde se comunicó una resistencia del 20% (31). Fernández y cols. (25), en Chile, hallan una tasa de resistencia similar a la obtenida en nuestro estudio (4,6%).

La amoxicilina-ácido clavulánico ha presentado la mejor sensibilidad en nuestro estudio, con ausencia de resistencia. Este hecho, el 100% de sensibilidad, es algo frecuentemente observado (26, 30, 31).

Por otro lado, el antibiótico que presentó menos actividad fue la tetraciclina, con una  $\text{CMI}_{90} > 128$  mg/l. La alta resistencia que encontramos a la tetraciclina es similar a la documentada en otro estudio (24). Aunque se han comunicado tasas de resistencia inferiores, éstas siguen demostrando la baja actividad de la tetraciclina frente a *C. jejuni* en nuestro medio (26). Como la tetraciclina es un antibiótico que no debe usarse en niños, el dato no tiene relevancia clínica en nuestro estudio.

Los resultados expuestos vuelven a poner de manifiesto que:

- En nuestro medio no deben usarse las quinolonas como tratamiento para las gastroenteritis causadas por *C. jejuni*.
- La utilidad de las quinolonas como tratamiento empírico de las enfermedades diarreicas agudas es limitada.
- En nuestro medio, *C. jejuni* presenta una buena sensibilidad a los macrólidos, antibióticos considerados como tratamiento de elección, y ausencia de resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico, incluida en las alternativas de tratamiento.

También queremos insistir en el hecho de que la resistencia a los macrólidos en nuestro medio, aunque baja, no es exclusiva de *C. coli* como hace años se pensaba (32).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Grande, A., Gayol, P., Redondo, J.C., González, P. *Infecciones gastrointestinales prevalentes en pediatría*. Bol Pediatr 1998; 38: 220-241.
2. Prats, G., Llovet, T., Muñoz, C., Solé, R., Mirelis, B. *Etiología de la enteritis en un hospital general universitario en Barcelona (1992-1995)*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1997; 15: 349-356.
3. Barnes, L.G., Uren, E., Stevens, B.K., Bishop, R. *Aetiology of acute gastroenteritis in hospitalised children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993*. J Clin Microbiol 1998; 36: 133-138.
4. Colomina, J., Raga, J., Gil, M.T., Buesa, J. *Respuesta de anticuerpos séricos y coproanticuerpos específicos en niños con gastroenteritis aguda por rotavirus*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1998; 16: 55-60.
5. Munk-Petersen, A., Vinther-Nielsen, S., Meyer, D., Ganer, P., Ladefoged, K. *Bacterial gastroenteritis among hospitalized patients in Danish Country, 1991-1993*. Scand J Gastroenterol 1996; 31: 906-911.
6. González-Hevia, M.A., Martín, M.C., Lobato, M.J., Gutiérrez, F., Solano, P., Álvarez-Riesgo, J.A. *Salmonella y salmonelosis en el Principado de Asturias durante un período de siete años (1990-1996)*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1999; 17: 166-170.
7. Pérez-Ciordia, I., Rezusta, A., Mairal, P., Larrosa, A., Herrera, D., Martínez-Navarro, F. *Estudio comparativo de las infecciones por Salmonella y Campylobacter en Huesca 1996-1999*. Rev Esp Salud Pública 2001; 75: 459-465.
8. Nylen, G., Dunstan, F., Palmer, S.R. y cols. *The seasonal distribution of Campylobacter infections in nine European countries and New Zealand*. Epidemiol Infect 2002; 128: 383-390.
9. Blaser, M.J. *Campylobacter species*. En: Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (Ed.). Principles and practice of infectious diseases. John Wiley & Sons, Toronto 1990; 1649-1658.
10. Nachamkin, I. *Campylobacter and Arcobacter*. En: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.A., Tenover, R.H. (Eds.). Manual of Clinical Microbiology. A.S.M. Press, Washington, D.C., 1999; 716-726.
11. Raultelin, H., Jusufovic, J., Hänninen, M.L. *Identification of hippurate-negative thermophilic campylobacters*. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35: 9-12.
12. Houg, H., Sethabutr, O., Nirdnoy, W., Katz, D.E., Pang, L.W. *Development of a ceuE-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Thailand*. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 40: 11-19.
13. Al Rashid, S.T., Dakuna, I., Louie, H., Vandamme, P., Chan, V.L. *Identification of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, Arcobacter butzleri, and A. butzleri-like species based on the glyA gene*. J Clin Microbiol 2000; 38: 1488-1494.
14. Van Doorn, L.J., van Haperen, A., Burnens, A. y cols. *Rapid identification of thermotolerant Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Campylobacter lari, and Campylobacter upsaliensis from various geographic locations by GTPase-based PCR-reverse hybridization assay*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1790-1796.
15. Logan, J.M.J., Edwards, K.J., Saunders, N.A., Stanley, J. *Rapid identification of Campylobacter spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR*. J Clin Microbiol 2001; 39: 2227-2232.
16. Allos, B.M., Blaser, M.J. *Campylobacter jejuni and the expanding spectrum of related infections*. Clin Infect Dis 1995; 20: 1092-1101.
17. Enberg, J., Aarestrup, F.M., Taylor, D.E., Gerner-Smidt, P., Nachamkin, I. *Quinolone and macrolide resistance in Campylobacter jejuni and C. coli: Resistance mechanisms and trends in human isolates*. Emerg Infect Dis 2001; 7: 24-34.
18. Smith, K.E., Besser, J.M., Hedberg, C.W. y cols. *Quinolone resistant Campylobacter jejuni infections in Minnesota, 1992-1998*. N Engl J Med 1999; 340: 1525-1532.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Tenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S10 (M 7). Wayne, Pennsylvania 1999.
20. Hakanene, A., Huovinen, P. *Quality control strains used in susceptibility testing of Campylobacter spp.* J Clin Microbiol 2002; 40: 2705-2706.
21. Alcalde, C., Gómez, L., Carrascal, M.I. y cols. *Gastroenteritis aguda en pacientes hospitalizados. Estudio evolutivo de 14 años*. An Esp Pediat 2002; 56: 104-110.
22. Travers, K., Barza, M. *Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria*. Clin Infect Dis 2002; 34 (Suppl. 3): 131-134.
23. Saénz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M.J., Baquero, F., Torres, C. *Antibiotic resistance in Campylobacter strains isolated from animals, foods and human in Spain in 1997-1998*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 267-271.
24. Fernández-Roblas, R., Cabria, F., Esteban, J., López, J.C., Gadea, I., Soriano, F. *In vitro activity of gemifloxacin (SB-265805) compared with 14 other antimicrobials against intestinal pathogens*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 1023-1027.

25. Fernández, H., Mansilla, M., González, V. *Antimicrobial susceptibility of Campylobacter jejuni subsp. jejuni assessed by E-test and double dilution agar method in southern Chile*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 247-249.
26. Gómez-Garcés, J.L., Alós, J.I., Cogollos, R. *Susceptibilities of fluorquinolone-resistant strains of Campylobacter jejuni to 11 oral antimicrobial agents*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 542-544.
27. Moore, J.E., Crowe, M., Heaney, N., Crothers, E. *Antibiotic resistance in Campylobacter spp. isolated from human faeces (1980-2000) and foods (1997-2000) in Northern Ireland: An update*. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 455-457.
28. Wintermeyer, S.M., Abdel-Rahman, S.M., Nahata, M.C. *Dirithromycin: A new macrolide*. Ann Pharmacother 1996; 30: 1141-1149.
29. Jones, K., Felmingham, D., Ridgway, G. *In vitro activity of azithromycin (CP-62,993), a novel macrolide, against enteric pathogens*. Drugs Exp Clin Res 1988; 14: 613-615.
30. Tajada, P., Gómez-Garcés, J.L., Alós, J.I., Balas, D., Cogollos, R. *Antimicrobial susceptibilities of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1924-1925.
31. Lachance, N., Gaudreau, C., Lamothe, F., Larivière, L.A. *Role of the beta-lactamase of Campylobacter jejuni in resistance to beta-lactam agents*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 813-818.
32. Reina, J., Ros, M.J., Serra, A. *Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1220 Campylobacter strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 2917-2920.