

Susceptibilidad de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* a la penicilina y a la tetraciclina

Clara Inés de Vargas, Olga Marina Sanabria, María Claudia Vela, Elizabeth Castañeda

Resumen

La vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* es necesaria, debido a la capacidad de este patógeno para desarrollar resistencia por varios mecanismos, con las consecuentes fallas en el tratamiento. En un trabajo anterior, realizado en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, en el que se empleó la prueba de difusión de disco (Kirby-Bauer), se determinó en 43 aislamientos de *N. gonorrhoeae* no productores de beta-lactamasa, susceptibilidad intermedia a la penicilina en 42 y resistencia a la tetraciclina en 26. Por tal razón, se decidió establecer en todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae*, remitidos al INS como parte del programa de red de ETS bacterianas, los niveles de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina, expresados como la concentración inhibitoria mínima (CIM). De 100 aislamientos estudiados, 49 fueron no productores de beta-lactamasa (NPBL) y 51 productores (PBL). La CIM de la penicilina de los aislamientos NPBL fue menor o igual a 0,06 µg/mL (sensible) en 3; de 0,12-1 µg/mL (intermedia) en 41; y mayor o igual a 2 µg/mL en 5. La CIM de los aislamientos PBL señaló que 4 eran intermedios y 47 resistentes. La CIM de la tetraciclina fue menor o igual a 0,25 µg/mL (sensible) en 4, de 0,5 a µg/mL (intermedia) en 18 y mayor o igual a 2 µg/mL (resistente) en 78. Los datos destacan la importancia de mantener la vigilancia de la resistencia de *N. gonorrhoeae* a estos antimicrobianos para que, con base en ellos, se replanteen los esquemas de tratamiento.

Summary

A surveillance program of the antimicrobial susceptibility was established to determine antimicrobial resistance to *Neisseria gonorrhoeae*. We used the Kirby Bauer test to show that 42 out of 43 *N. gonorrhoeae* isolates of non beta lactamase producers (NBLP) presented an intermediate susceptibility level to penicillin. 26 of the same isolates were resistant to tetracycline. The minimal inhibitory concentration (MIC) to the two antimicrobials was determined in the 100 *N. gonorrhoeae* isolates from an STD program. From these 100 isolates, 49 were NPBL and 51 were PBL. MIC's to penicillin from the isolates PBL were interpreted as sensitive (<0.06µg/mL) in 3 isolates, intermediate (0.12-1µg/mL) in 41, and resistant (>2µg/mL) in 5. MIC's to penicillin from the isolates PBL showed that 4 were intermediate and 47 resistant. MIC's to tetracycline showed 4 isolates sensitive (<0.25µg/mL), 18 intermediate (0,5-1µg/mL) and 72 isolates resistant (>2µg/mL). This study indicated the need for surveillance programs for management of antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* and treatment schedules.

En 1943, cuando la penicilina empezó a ser utilizada para controlar la infección por *Neisseria gonorrhoeae*, la dosis indicada para el tratamiento era de 50.000 a 100.000 UI y los aislamientos presentaban una concentración inhibitoria mínima (CIM) menor de 0,0015 µg/mL a ese antibiótico. Rápidamente se observó que era necesario aumentar la dosis a 4 o 5'000.000 UI de penicilina para evitar las fallas terapéuticas; además, en una revisión hecha por Dallabeta se informó que, ya en 1972, 95% de los aislamientos presentaban una CIM menor de 0,90 µg/mL (1).

Los mecanismos de la resistencia de *N. gonorrhoeae* pueden estar mediados por plásmidos, o por una o varias mutaciones cromosómicas (2). En 1976, aparecieron en Inglaterra los primeros aislamientos resistentes debidos al plásmido TEM, productor de beta-lactamasa y, en 1985, se describió, en Estados Unidos, un segundo plásmido llamado tet M, mediador de la resistencia a la tetraciclina (2).

La resistencia cromosómica se presenta a la penicilina, la tetraciclina, la eritromicina, la espectinomicina, los aminoglucósidos y las sulfonamidas; es más prevalente en los sitios donde los antibióticos orales se obtienen sin prescripción médica. Los aislamientos resistentes causan infecciones en todo tipo de población, con características clínicas similares para todos; sin embargo, al prolongarse la infección por tratamientos inadecuados, se incrementan las secuelas y el número de compañeros sexuales infectados (1, 2).

En Colombia, de acuerdo con un trabajo realizado en Medellín por Pineda y Montoya (3), hasta 1979 no se habían registrado aislamientos productores de beta-lactamasa (PBL). En un trabajo de Urbina en 1978 (4), se documentó que 78% de los aislamientos tenían una CIM para la penicilina menor de 1 µg/mL. En 1986, Arango y colaboradores describieron en Medellín (5), 5% de aislamientos PBL. En 1993, en un trabajo realizado en el Instituto Nacional de Salud (INS) se determinó que 48% de los aislamientos remitidos para confirmación, por diferentes servicios de salud eran PBL y 98%

de los no PBL presentaron una susceptibilidad intermedia a la penicilina determinada por el método de Kirby-Bauer (6).

Por tal razón, se decidió determinar en todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae* remitidos al INS, la CIM de la penicilina y tetraciclina y anotar la concordancia de estos resultados con los de difusión en agar por el método de Kirby-Bauer. La remisión de los aislamientos se realiza como parte del programa de red de enfermedades de transmisión sexual (ETS) bacterianas.

Materiales y métodos

Aislamientos: se estudiaron 100 aislamientos de *N. gonorrhoeae*, enviados por los servicios de salud para la confirmación y la realización de las pruebas de susceptibilidad.

Todos los aislamientos se confirmaron por la morfología macroscópica y microscópica con el empleo de la coloración de Gram, por la determinación de la citocromooxidasa y la fermentación de la glucosa en el medio de CTA (BBL) (7).

De los 100 aislamientos de *N. gonorrhoeae*, 81 se recibieron entre 1984 y 1993 y corresponden al estudio publicado en 1994 (6) y 19 se recibieron durante 1994.

Cepas control: se utilizaron como cepas control *N. gonorrhoeae*, ATCC 49226, y *Staphylococcus aureus*, ATCC 229213 y ATCC 25923.

Pruebas de susceptibilidad: se determinó la presencia de la beta lactamasa por la técnica cromogénica con los discos de cefinasa (BBL) (7).

La prueba de susceptibilidad de difusión de disco se realizó con el método recomendado por *The National Committee on Clinical Laboratory Standards* (NCCLS): Kirby-Bauer en agar GC con 1% de IsoVitalex (BBL)(8). Se utilizaron discos de penicilina 10U (Difco), tetraciclina 30µg (Difco), ceftriaxona 30µg (Difco) y espectinomicina 100µg (estos últimos preparados en el INS).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó para penicilina y tetraciclina (Sigma),

por el método de dilución en agar, con las recomendaciones del NCCLS (9). Brevemente, las diluciones del antibiótico se prepararon en agar GC (BBL) con suplemento (IsoVitalex) y la suspensión del microorganismo se realizó en caldo de tripticasa soya (BBL) a una concentración de 10⁴ UFC/mL. Los cultivos se incubaron por 22 horas a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. En cada prueba se utilizaron las cepas control y se determinó para cada aislamiento un control de crecimiento en agar GC sin antibiótico. Los medios se utilizaron durante los siete días siguientes después de su preparación (9, 10).

Las lecturas se realizaron a las 22 horas de incubación; se consideró como CIM la menor concentración del antibiótico en la que no hubo crecimiento. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con los rangos dados por el NCCLS (8-10).

Resultados

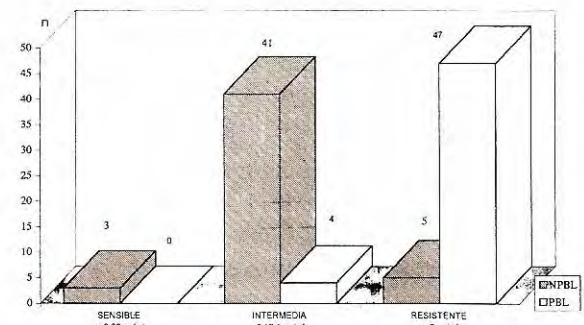
De los 100 aislamientos de *N. gonorrhoeae* recibidos de 1983 a 1994, 26 eran de hombres y 74 de mujeres. De estos aislamientos, 51 eran productores de beta-lactamasa (PBL) y 49 no productores de beta-lactamasa (NPBL).

En el cuadro 1 se observan los resultados de la susceptibilidad de los 100 aislamientos a los cuatro antibióticos probados, por el método de difusión de disco. De los 100 aislamientos, 56 fueron resistentes a penicilina, 85 a la tetraciclina y 7 a la espectinomicina. Todos los aislamientos fueron sensibles a la ceftriaxona. Por el mismo método, de los 49 aislamientos NPBL, 44 (89,7%) presentaron resistencia

intermedia a la penicilina y 5 (10,3%) resistencia total.

Los resultados de la CIM a la penicilina de los aislamientos PBL y NPBL se presentan en la figura 1; se observa que de los 49 aislamientos NPBL, 3 (6%) eran sensibles, 41 (84%) tenían sensibilidad intermedia y 5 (10%) eran resistentes a la penicilina. La mínima CIM a la penicilina fue de 0,03 µg/mL y la máxima de 4 µg/mL. La media de la CIM fue de 0,66 µg/mL. En cuanto a los 51 aislamientos PBL, se determinó que 4 (78,4%) tenían una sensibilidad intermedia con una CIM de 0,5 µg/mL.

Figura 1. Concentración inhibitoria mínima de la penicilina de los 100 aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*



La CIM de la tetraciclina determinó 4 aislamientos sensibles a la tetraciclina, 18 con sensibilidad intermedia y 78 resistentes. De los aislamientos resistentes, 8 (13%) tenían una CIM de 4 µg/mL y 60 (87%) menores de 4µg/mL. La CIM a la tetraciclina de todos los aislamientos estuvo entre 0,062 µg/mL y menos de 4µg/mL.

El promedio de concordancia de las dos técnicas (difusión de disco y CIM) en la determinación de la sensibilidad de todos los aislamientos fue de 89% para la penicilina y de 71% para la tetraciclina (cuadro 2).

Discusión

La mayoría de los aislamientos correspondieron a mujeres, debido a que se realizan con mayor frecuencia cultivos cervicales que uretrales; por

Cuadro 1. Resultados de la prueba de susceptibilidad de los 100 aislamientos de *N. gonorrhoeae* por el método de Kirby-Bauer

Antibiótico	Susceptibilidad (n=100)		
	Sensible	Intermedia	Resistente
Penicilina 10 UI		44	56
Tetraciclina 30 µg	4	11	85
Espectinomicina 100 µg	93		7
Ceftriaxona 30 µg	100		

Cuadro 2. Concordancia del método de difusión de disco (Kirby-Bauer) y de la CIM (dilución en agar) a la penicilina y la tetraciclina en los 100 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

Antibiótico	n	Técnica empleada						Concordancia*
		Kirby-Bauer Interpretación			CIM Interpretación			
		S	I	R	S	I	R	
Penicilina	44		44		3	39	2	88,6% (I)
	56			56		6	50	89,3% (R)
Tetraciclina	4	4			2	2		50,0% (S)
	11		11		2	8	1	73,0% (I)
	85			85		8	77	92,8% (R)

* La concordancia se determinó como la relación de la interpretación de los resultados por las dos técnicas.

S: sensible

I: intermedia

R: resistente

tanto, no representa mayor frecuencia de la infección por *N. gonorrhoeae* en las mujeres.

Los resultados de la susceptibilidad de los aislamientos estudiados no son indicadores de la situación del país, ya que no se tienen aislamientos de todas las regiones, ni se conoce la frecuencia de la enfermedad, ni las condiciones o antecedentes de los pacientes.

La sensibilidad a la penicilina de los aislamientos NPBL está disminuida. Esta resistencia se debe, posiblemente, a mecanismos cromosómicos (2).

Como se observa, *N. gonorrhoeae* es capaz de desarrollar resistencia por diferentes mecanismos; se presentó alta resistencia a la penicilina y a la tetraciclina; también, se encontró resistencia a la espectinomicina, de la cual existen varios informes en la literatura (6, 11), por lo cual es necesario mantener la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana, tanto en los aislamientos PBL como los NPBL para evitar fallas en el tratamiento, aumento en los costos de éste y secuelas tan graves como la infertilidad (1, 12).

Se encontraron aislamientos PBL que tenían una sensibilidad intermedia por el método de CIM. Estos datos están en concordancia con lo descrito en otras investigaciones (13).

Es necesario replantear los esquemas de tratamiento y determinar las drogas de primera elección para el tratamiento de la infección gonocócica; además, mantener la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* a esos antimicrobianos debido a la habilidad, ya descrita, de este microorganismo a desarrollar resistencia antimicrobiana por diferentes mecanismos.

En el Laboratorio de Microbiología del INS la concordancia de las dos técnicas empleadas fue buena, por lo cual la técnica de difusión de disco se puede considerar como una buena alternativa para la vigilancia de la susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a la penicilina y a la tetraciclina (8, 9).

Agradecimientos

A los bacteriólogos Nayar Hatum del Servicio de Salud del Amazonas, Lourdes Benítez del Servicio de Salud de Antioquia, Mabel Merino del Servicio de Salud de Atlántico, Carmen Rosa Gallego del Servicio de Salud de Bogotá, María Elsy Martínez del Servicio de Salud de Caldas, Lucy Galeano de la Secretaría de Salud de Cali, María Raquel Díaz del Servicio de Salud de Nariño, Vianey Portilla del Servicio de Salud de Santander, Marly Suárez del Servicio del

Tolima y Eunice Ramírez del Servicio de Salud de Valle, por su participación en el programa de red del Laboratorio de Microbiología de ETS bacterianas.

Referencias

1. **Dallabetta G, Hook EW.** Gonococcal infections. *Inf Dis Clin North Am* 1987;1:25-54.
2. **Steven R, Johnson P, Stephen A, Morse P.** Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: genetics and mechanisms of resistance. *Sex Trans Dis* 1988; 15:217-24.
3. **Pineda F, Montoya F.** Búsqueda de *Neisseria gonorrhoeae* productoras de beta-lactamasa. *Acta Méd Colomb* 1979;4:167-74.
4. **Urbina D, Montoya F.** Determinación de la concentración inhibitoria mínima CIM de penicilina G requerida por cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en la ciudad de Medellín. *Acta Méd Colomb* 1978;3:1-9.
5. **Arango C, Bergonzoli, Zafra G, Sarria MN.** Prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* productora de beta-lactamasa. *Colombia Médica* 1986;17:70-4.
6. **Vela MC, Vargas CI, Castañeda E.** Determinación de la beta-lactamasa en cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. *Biomédica* 1994;14:16-21.
7. **Knapp JS, Rice RJ.** *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Sixth edition. Washington, D.C.: ASM; 1995:324-40.
8. **Jorgensen JH, Cleeland R, Caring WA, et al.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Fifth edition. NCCLS; 1993:3.
9. **Jorgensen JH, Cleeland R, Caring WA, et al.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Third edition. NCCLS; 1993:13.
10. **Jones RN, Gavan TL, Thornsberry C, et al.** Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: interpretative criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin and tetracycline. *J Clin Microbiol* 1989;27:2758-66.
11. **Zenilman JM, Nims LJ, Menegus MA, Nolte F, Knapp JS.** Spectinomycin resistant gonococcal infections in the United States 1985-1986. *J infect Dis* 1987;156:1002-4.
12. **Centers for Disease Control.** Antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Policy guidelines for detection management and control. *MMWR* 1987;36.
13. **Putnam SD, Lavin BS, Stone JR, Oldfield EC, Hooper DG.** Evaluation of the standardized disk diffusion and agar dilution antibiotic susceptibility test methods by using strains of *Neisseria gonorrhoeae* from the United States and Southeast Asia. *J Clin Microb* 1992;30:974-80.