



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA-LABORATORIO CLINICO



INVESTIGACION DE LA ENZIMA BETA LACTAMASA POR LOS  
METODOS ACIDOMETRICO Y YODOMETRICO RAPIDO EN TIRA  
DE PAPEL, EN CEPAS DE NEISSERIA GONORRHOEAE, HEMO-  
PHILUS INFLUENZAE Y STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

SEMINARIO DE GRADUACION PRESENTADO POR:  
BR. REINA ROSARIO AGUILLON RUANO  
BR. MARTA ALICIA MELGAR MARTINEZ  
TM. ROSA DEL CARMEN NAVES VILLAVICENCIO DE RUANO

PREVIA OPCION AL TITULO DE  
LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

FEBRERO DE 1986



SAN SALVADOR

EL SALVADOR

CENTRO AMERICA

1  
574.1925  
A283i

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

Dr. Miguel Angel Parada

SECRETARIO GENERAL:

Dra. Ana Gloria Castaneda Padilla

FACULTAD DE MEDICINA

DECANO:

Dr. José Ascención Marinero Cáceres

SECRETARIO:

Dr. Herbert Wilfredo Barillas

A S E S O R

DR. CARLOS RENE FLORES MENENDEZ

J U R A D O   D E   S E M I N A R I O

- 1) Dra. Leonor Isabel Murillo de Linares
- 2) Dr. René Ezequiel Menjívar
- 3) Dr. Feliciano Efraín Mena

D E D I C A T O R I A

A DIOS TODOPODEROSO

A NUESTRAS FAMILIAS

## A G R A D E C I M I E N T O

- 1) Al Dr. CARLOS R. FLORES MENENDEZ por su orientación científica para la realización de este trabajo.
- 2) A la Dra. LEONOR ISABEL MURILLO DE LINARES por su valiosa colaboración.
- 3) Nuestro reconocimiento al Dr. ROMULO SOSA CACERES; Jefe del Laboratorio Clínico del I.S.S.S.
- 4) A los Miembros del Jurado por sus adecuadas observaciones.
- 5) A la Sección de Bacteriología y de Preparaduría del I.S.S.S.
- 6) A la Sección de Bacteriología del Hospital de Niños Benjamín Bloom.

# I N D I C E

	Página
I. Introducción . . . . .	1
II. Objetivos . . . . .	5
III. Materiales y Métodos . . . . .	6
IV. Resultados . . . . .	14
V. Discusión . . . . .	22
VI. Conclusiones . . . . .	32
VII. Recomendaciones . . . . .	33
VIII. Bibliografía . . . . .	34

## I N T R O D U C C I O N

Neisseria gonorrhoeae, Hemophilus influenzae y ---  
Streptococcus pneumoniae son causa importante de enfermedad. Por muchos años se ha utilizado la penicilina como el antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones producidas por estas bacterias. Sin embargo, durante los últimos 30 años, la resistencia de diferentes microorganismos a la penicilina G, incluyendo a estos tres, ha aumentado gradualmente de manera que en la actualidad, por lo menos en el caso de N.gonorrhoeae, muchas cepas requieren dosis altas de penicilina G para ser inhibidas (17).

Neisseria gonorrhoeae es el agente causal de la gonorrea y de algunos casos de oftalmía neonatorum y de infecciones como artritis, cervicitis, salpingitis, septicemia y otros. Antes de 1976 esta bacteria era altamente susceptible a la penicilina; sin embargo, en ese mismo año se demostró por primera vez, la existencia de gonococos resistentes a este antibiótico (7,17). Aunque su prevalencia era baja, en algunos grupos poblacionales, el aislamiento de cepas resistentes fue del 50% (17). Dicha resistencia usualmente es debida a la producción de la enzima beta-lactamasa la cual es controlada genéticamente por un plasmidio (17,39). En El Salvador, hasta donde se sabe, no se han realizado estu-

dios referentes al problema de las cepas de N. gonorrhoeae resistentes a la penicilina.

Hemophilus influenzae, particularmente el tipo b, es productor de infecciones supurativas respiratorias (sinusitis, laringotraqueitis, epiglotitis), otitis y meningitis en niños pequeños (17). El contacto con pacientes que sufren la infección clínica de H. influenzae es de escaso riesgo para los adultos pero representa un verdadero riesgo para los niños menores de 4 años (17). La tasa de mortalidad de meningitis provocada por H. influenzae puede llegar hasta 90% (17). En los Estados Unidos por ejemplo, han sido estimados 10,000 casos anuales de meningitis debido a este organismo, de los cuales la mayoría ocurre en niños (20). En El Salvador se desconocen las cifras exactas en relación al número de casos estimados por año; sin embargo, en un trabajo efectuado en el hospital de niños Benjamín Bloom, se encontró que H. influenzae era el agente causal de meningitis en un 10% de los casos (11).

En relación al problema de adquisición de resistencia a los antibióticos por H. influenzae, los resultados reportados son muy variados. En general, la frecuencia de aislamiento de cepas resistentes en la población infantil, varía entre los obtenidos por Syriopoulou y colaboradores de 16%

en Huntsville (37) y las de Nelson, de 22% en Dallas (29). Así como en el caso de N. gonorrhoeae, esta resistencia es conferida a H. influenzae por la producción de beta-lactamasa controlada por un plasmidio transmisible (17). En nuestro país cepas resistentes a la penicilina (definidas como resistentes en base a antibiogramas) se han reportado en niños con una frecuencia de un 23% (10); sin embargo, no se han realizado estudios de detección de beta-lactamasa para atribuir la resistencia a esa enzima.

Streptococcus pneumoniae es causa importante de diferentes afecciones en el humano, tales como neumonía lobular, meningitis, otitis media, peritonitis, endocarditis y otras enfermedades (3). Esta bacteria es muy sensible a los antimicrobianos y el tratamiento temprano da por resultado una rápida curación. Sin embargo, en los últimos años, en Africa del Sur, Gran Bretaña y Australia se han reportado neumococos resistentes a varios antibióticos entre ellos penicilina, tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol (16,17). En Nueva Guinea y Africa del Sur, han ocurrido brotes de enfermedad por neumococos con gran resistencia a la penicilina, con extensa diseminación de estos gérmenes entre el personal de los hospitales (17). Aislamientos recientes de S. pneumoniae relativamente resistentes a la penicilina han sido encontrados hasta en un 3% en los Estados Unidos (16). Esta resistencia no se ha demostrado que sea debida a la producción de beta-lactamasa. En El Salvador, afortunadamente la resistencia

del neumococo a la penicilina, no obstante el aparecimiento ocasional de cepas resistentes, todavía no constituye un problema serio. Por ejemplo, en un estudio efectuado en nuestro país en 1979 (10), en la población infantil y basado en antibiogramas, no se encontró resistencia del S. pneumoniae a la penicilina, pero sí a la ampicilina en un 6.6%.

Como se ha señalado arriba, los organismos de los géneros Neisseria, Hemophilus y Streptococcus causan infecciones en la mayor parte del mundo y nuestro país no es la --- excepción. Por ejemplo, en 1982 se reportaron en el laboratorio clínico del hospital general del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (I.S.S.S.), 32 casos de enfermedad por N. gonorrhoeae, 2 por Hemophilus sp. y 39 por S. pneumoniae. La mayoría de las cepas de los primeros dos organismos fueron sensibles a la penicilina pero se encontraron 2 cepas de N. gonorrhoeae resistentes a la penicilina y ampicilina; no se estudió la sensibilidad del S. pneumoniae a los quimioterapéuticos. A pesar de la gran relevancia --- médico-práctica que tiene la resistencia de estas bacterias a los antibióticos beta-lactámicos, en este país no se ha investigado este fenómeno en forma sistemática ni mucho menos se ha asociado esta característica con la producción de beta-lactamasa para conocer el mecanismo que explique esta resistencia.

## O B J E T I V O S

1. Determinar la producción de beta-lactamasa por los métodos Acidométrico y Yodométrico Rápido en Tira de Papel, en cepas bacterianas pertenecientes a las especies Neisseria gonorrhoeae, Hemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae.
2. Correlacionar la producción de beta-lactamasa con la resistencia a los antibióticos presentada "in vitro" por estos microorganismos, determinada por el método de Kirby-Bauer.
3. Evaluar la factibilidad de que en base a su eficiencia, simplicidad y costo, alguna de las técnicas para detección de beta-lactamasa pueda ser incorporada al conjunto de procedimientos rutinarios de estudio de las bacterias, en los laboratorios clínicos del país.

## MATERIALES Y METODOS

Cepas Bacterianas Estudiadas. Se estudiaron 100 cepas bacterianas: 47 de Neisseria gonorrhoeae, 11 de Hemophilus influenzae y 42 de Streptococcus pneumoniae, todas aisladas de diferentes muestras clínicas provenientes de pacientes hospitalizados y de consulta externa tanto del hospital general del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (I.S.S.S.) como del hospital de niños Benjamín Bloom (tabla 1). Todas las muestras se inocularon en placas de agar chocolate\* y agar sangre\* y se incubaron en atmósfera del 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas. Las colonias sospechosas fueron examinadas por el método de Gram. Si la morfología de los microorganismos aislados correspondía a la de alguna de las especies de interés para este estudio, se hicieron las pruebas presuntivas y confirmativas del caso según la metodología recomendada por la Asociación Americana de Microbiología (20). Después de identificar la especie bacteriana se determinó la susceptibilidad a los antimicrobianos por el procedimiento de Kirby-Bauer (20) y se detectó la producción de la enzima beta-lactamasa por los métodos Acidométrico y Yodométrico Rápido en Tira de Papel (20).

---

\* BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA

### Método Utilizado para Determinar la Susceptibilidad a los Antimicrobianos

Se verificó la prueba estandarizada de difusión en --- agar, por el método de Kirby-Bauer (20). Se preparó una suspensión bacteriana en caldo de Müller Hinton\* de turbidez equivalente a la del tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland (20).

Con un asa estéril se tomó una muestra de esta suspensión y se inoculó la superficie de una placa de agar chocolate de Müller Hinton, suplementado con 1% de Isovitalex\* (3), de tal forma que se pudiera obtener un crecimiento confluyente. Inmediatamente después se colocaron los discos conteniendo penicilina y ampicilina en el área inoculada. Todo el material en estudio se incubó en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> por 18-24 horas a 37°C (20).

### Métodos para Determinar la Producción de la Enzima Beta-Lactamasa

Existen diferentes métodos para detectar la enzima -- beta-lactamasa producida por las bacterias. Estos procedimientos evalúan en forma indirecta, la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos como penicilina, ampicilina y cefalosporina (19). Entre estos métodos se encuentran el

---

\* BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA

Yodométrico Rápido en Tira de Papel (20), el Acidométrico (20), el método Cromogénico con Cefalosporina (2), Ensayo Radioisotópico (40) y otros. Para este estudio fueron seleccionados los métodos Yodométrico y Acidométrico, por ser considerados los más prácticos y más fácilmente reproducibles. Ambos se detallan a continuación:

Metodo Yodométrico Rápido en Tira de Papel: La interacción química de una solución de almidón y yodo da lugar a la formación de un complejo de color morado. Si a una solución similar se le agrega penicilina y luego se mezcla una suspensión de bacterias productoras de penicilinasas, la enzima producida por las bacterias actúa sobre la penicilina del medio produciéndose el ácido peniciloico, el cual reduce el yodo a yoduro. Este último no reacciona con el almidón, por consiguiente no hay formación de complejo morado y desaparece el que ya está formado, observándose una decoloración de la solución (21,30).

Procedimiento:

Para simplificar el método original se usan los reactivos impregnados en tira de papel filtro (21,30).

a) Impréguese una tira de papel filtro con una solución de almidón soluble y penicilina G potásica. Satúrese con solución de lugol de gram; quítese el exceso de lugol colo-

cando las tiras en papel toalla absorbente o en una caja de petri.

b) Inocúlese con un asa los microorganismos a examinar, extendiéndolo en la tira de papel en forma circular cubriendo un área aproximadamente de 5 mms de diámetro.

c) Obsérvese 1 minuto. Si la bacteria produce beta-lactamasa, el área del sitio de inoculación se vuelve blanca. Si permanece púrpura o se convierte en amarillo pálido, considérese negativo.

Reactivos:

a) Lugol de gram: Cristales de yodo 1 gr.  
Yoduro de potasio 2 gr.

Disuélvase completamente en 5 ml de agua destilada y agréguese:

Agua destilada	240 ml
Bicarbonato de sodio 5%	60 ml

mézclese y guárdese en frasco de vidrio ámbar (3).

b) Solución al 0.2% de almidón soluble en 1% de penicilina (penicilina G potásica para inyecciones):

1) Agréguese 0.1 gr de almidón soluble a 45 ml de agua estéril desmineralizada. Caliéntese la solución hasta disolución y déjese a temperatura de la habitación.

2) Disuélvase el contenido de un vial de penicilina G potásica de 1 millón de unidades (U) por ml con 9.6 ml.

de agua bidestilada para lograr una concentración de 100.000 U por ml. Agréguese 5 ml de esta solución de penicilina ya preparada, a la solución homogénea de almidón hasta alcanzar una concentración final de 10,000 U por ml (30).

Preparación de las Tiras:

- a) Córtese papel filtro (whatman #3) en tiras de 5 x 1 cm.
- b) Sumérjense las tiras una por una en la mezcla de penicilina-almidón y escúrranse.
- c) Déjense secar a temperatura ambiente.
- d) Colóquense las tiras en frascos plásticos y guárdense a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para evitar pérdida de actividad (son estables por más de un año a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). (2,30).

Este método tiene las ventajas siguientes: Es muy sensible y confiable. La prueba puede ser realizada con las colonias del aislamiento primario. Se pueden realizar 6-8 pruebas en una misma tira. No necesita de un pH determinado. La esterilidad no es un factor indispensable para realizar la prueba. Los reactivos son de un precio relativamente bajo y fáciles de adquirir (30).

Método Acidométrico: Consiste en observar un cambio de coloración que vira de rojo a amarillo al poner a reaccionar una suspensión de bacterias productoras de penicilina con el substrato que contiene penicilina G sódica y

rojo de fenol como indicador. La ruptura del anillo beta-lactámico da lugar a la producción de ácido peniciloico cuyo pH es más ácido que el de la penicilina y causa el cambio de color del indicador (8,20).

Procedimiento:

a) Prepárese una suspensión espesa de bacterias a partir de colonias obtenidas de un cultivo puro de cada cepa aislada recientemente, con 0.05 ml. de solución salina estéril, en pocitos de microcubetas o en tubos pequeños estériles, hasta obtener una suspensión equivalente a la del tubo #5 de la escala de Mc. Farland.

b) Mézclese 0.05 ml. de substrato que contiene penicilina G sódica y rojo de fenol.

Si la bacteria produce beta-lactamasa la mezcla cambiará del color rojo al amarillo entre 1-15 minutos (20).

Reactivos:

a) Agréguese 2 ml. de una solución de rojo de fenol al 0.5% (como indicador) a 16.6 ml. de agua destilada estéril e inyéctese esta mezcla a una ampolla de penicilina G sódica de  $20 \times 10^6$  U, recomendado para uso parenteral (20).

b) Transfiérase esta mezcla a un tubo de ensayo y agréguese NaOH 1 M gota a gota hasta alcanzar un pH de 8.5 lo --

cual se pone de manifiesto por el desarrollo de un color violeta (9,20).

c) Si la solución no se usa inmediatamente deberá guardarse congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  (20).

Este método tiene las ventajas de ser económico, y de que los materiales son fáciles de adquirir. Sin embargo, la preparación de los reactivos es un poco difícil porque necesariamente debe ajustarse cuidadosamente el pH en un potenciómetro, y conservarlos estériles. El substrato debe almacenarse a  $-70^{\circ}\text{C}$  (9,20).

Fecha:

HOJA DE COLECCION DE DATOS DE PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DE INFECCIONES CAUSADAS POR NEISSERIA GONORRHOEAE, HEMOPHILUS INFLUENZAE Y STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. LABORATORIO CLINICO DEL ISSS Y DEL HOSPITAL DE NIÑOS BENJAMIN BLOOM.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Número de registro en el laboratorio: \_\_\_\_\_

Servicio: \_\_\_\_\_

Fecha de ingreso: \_\_\_\_\_

Fecha de alta: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Motivo de ingreso: \_\_\_\_\_

Diagnóstico definitivo: \_\_\_\_\_

Tipo de infección: a) aguda

b) crónica

Localización de la infección: a) local

b) general

Tratamiento previo al ingreso: \_\_\_\_\_

Infección ha sido adquirida fuera o dentro del hospital? \_\_\_\_\_

Sintomatología: fiebre, cefalea, dolor, tos, disnea, disuria.

Tipo de tratamiento intrahospitalario? \_\_\_\_\_

Respondió al tratamiento intrahospitalario? Sí \_\_\_\_\_

No \_\_\_\_\_

FECHA DE TOMA DE MUESTRA PARA CULTIVO: \_\_\_\_\_

FECHA DE RESULTADO DEL CULTIVO: \_\_\_\_\_

SENSIBILIDAD BACTERIANA: \_\_\_\_\_

PRODUCCION DE BETA-LACTAMASA:

METODO YODOMETRICO: \_\_\_\_\_

METODO ACIDOMETRICO: \_\_\_\_\_

## R E S U L T A D O S

Las muestras de diferentes regiones anatómicas proveían de 87 pacientes atendidos en el I.S.S.S. (36 hospitalizados y 51 ambulatorios) y 13 en el hospital de niños Benjamín Bloom (12 hospitalizados y 1 ambulatorio) (Tabla 1).

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos con las 100 cepas bacterianas cuya producción de la enzima beta-lactamasa se estudió por las pruebas acidométrica y yodométrica. La producción de la beta-lactamasa se detectó sólo en 3 cepas, de las cuales 2 fueron de N. gonorrhoeae y 1 de S. pneumoniae. No se encontró en ninguna de H. influenzae.

La producción de beta-lactamasa fue detectada en todas las cepas positivas con las dos técnicas utilizadas.

De las dos cepas de N. gonorrhoeae productoras de beta-lactamasa, la primera se obtuvo de secreción oftálmica de un paciente hospitalizado; la segunda, de secreción uretral de un paciente ambulatorio. La cepa de S. pneumoniae beta-lactamasa positiva fue aislada de una muestra de esputo de un paciente hospitalizado. Todos los pacientes de los cuales se aislaron cepas productoras de beta-lactamasa fueron del sexo masculino.

En la Tabla 3, se presenta la correlación entre la producción de beta-lactamasa y la sensibilidad o resistencia a los dos antibióticos beta-lactámicos utilizados (penicilina y ampicilina). Como se puede ver, en el caso de N. gonorrhoeae y S. pneumoniae, las 3 cepas productoras de beta-lactamasa mostraron resistencia tanto a la penicilina como a la ampicilina. Las cepas negativas todas fueron sensibles a ambos antibióticos, con excepción de una cepa de cada una de esas especies que presentó resistencia a la penicilina y a la ampicilina sin producción de beta-lactamasa. En el caso de H. influenzae no se detectó producción de beta-lactamasa, pero sí se encontraron cepas resistentes. En la tabla 4 se presenta la distribución de las cepas de H. influenzae encontrados sensibles y/o resistentes a la penicilina y ampicilina. Esta tabla muestra que 4 cepas de H. influenzae fueron resistentes a la penicilina y al mismo tiempo (las mismas cepas) sensibles a la ampicilina, 3 cepas fueron resistentes a los dos antibióticos; otras 3 cepas, sensibles a ambos y 1 cepa fue sensible a la penicilina y resistente a la ampicilina (en total 11 cepas de H. influenzae).

El tiempo de reacción requerido por los dos procedimientos empleados para la determinación de beta-lactamasa fue diferente. El método Yodométrico requirió menos tiem-

po para dar una reacción visible, el tiempo mínimo fue de 30 segundos y el máximo de 7 minutos. Para el método Acido métrico, el tiempo mínimo fue de 1 minuto y el máximo fue de 15 minutos. En la tabla 5 se detallan los tiempos requeridos por cada una de las cepas positivas para dar visible la reacción.

T A B L A 1

Origen de los diferentes tipos de muestras clínicas obtenidas de 100 pacientes intra y extra hospitalarios

ORIGEN	TIPO DE MUESTRA	NUMERO DE MUESTRAS	CEPAS BACTERIANAS
- Aparato Genito Urinario	- Secreción vaginal	4	- <u>N. gonorrhoeae</u>
	- " uterina	1	- " "
	- " endometrial	1	- " "
	- " uretral	30	- " "
	- " vulvar	1	- " "
	- " cervical	1	- " "
	- Glándula Skene	1	- " "
	- Orina	2	- " "
		1	- <u>S. pneumoniae</u>
	- Semen	3	- <u>N. gonorrhoeae</u>
- Aparato Respiratorio	- Esputo	16	- <u>S. pneumoniae</u>
	- Secreción faríngea	10	- " "
	- Secreción nasal	3	- " "
	- Secreción bronquial	1	- " "
- Sistema Hematopoyético	- Sangre	5	- " "
		1	- <u>N. gonorrhoeae</u>
- Sistema Nervioso	- Líquido cefalorraquídeo	4	- <u>S. pneumoniae</u>
		5	- <u>H. influenzae</u>
	- " subdural	1	- " "
- Otros	- Secreción oftálmica	2	- " "
		2	- <u>S. pneumoniae</u>
		3	- <u>N. gonorrhoeae</u>
	- Líquido articular	2	- <u>H. influenzae</u>

T A B L A    2

Resultados de las pruebas Acidométricas y Yodométricas para la detección de beta-lactamasa en 100 cepas bacterianas estudiadas.

Especie Bacteriana	# Cepas Estudiadas	Prueba de beta-lactamasa *			
		Positiva	%	Negativa	%
<u>N. gonorrhoeae</u>	47	2	(4.25)	45	( 95.74)
<u>S. pneumoniae</u>	42	1	(2.38)	41	( 97.62)
<u>H. influenzae</u>	11	0	(0.0 )	11	(100.00)

\* Los cultivos positivos de N. gonorrhoeae y de S. pneumoniae fueron positivos a los dos métodos.

T A B L A 3

Correlación entre la sensibilidad y la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos dada por la producción de beta-lactamasa en los diferentes tipos de bacterias estudiadas.

Especie Bacteriana	Producción de Beta-lactamasa	Penicilina		Ampicilina		Total Cepas
		S*	R	S	R	
<u>N. gonorrhoeae</u>	Positiva	0	2	0	2	2
	Negativa	44	1	44	1	45
<u>S. pneumoniae</u>	Positivo	0	1	0	1	1
	Negativo	40	1	40	1	41
<u>H. influenzae</u>	Positivo	0	0	0	0	0
	Negativo	4	7	7	4	11

\*S y R significan sensible y resistente, respectivamente.

T A B L A 4

Distribución de las cepas de H. influenzae encontradas sensibles y/o resistentes a la penicilina y ampicilina.

Especie Bacteriana	Antibióticos	Penicilina		Ampicilina		Total de Cepas
		S*	R	S	R	
<u>H. influenzae</u>			4	4		4
			3		3	3
		3		3		3
		1		1		1

\*S y R significan sensible y resistente, respectivamente.

T A B L A 5

Tiempo de reacción requerido por los métodos empleados para la detección de Beta-lactamasa.

Cepa bacteriana	M é t o d o s	
	Yodométrico	Acidométrico
<u>N. gonorrhoeae</u>	30 segundos	1 minuto
<u>N. gonorrhoeae</u>	1 minuto	3 minutos
<u>S. pneumoniae</u>	7 minutos	15 minutos

BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

## D I S C U S I O N

La observación empírica y la evaluación de la resisten cia bacteriana a los antimicrobianos, preferentemente en - los grandes hospitales de la mayor parte del mundo, ha reve lado un aumento en la frecuencia de infecciones graves producidas por diversas cepas bacterianas resistentes a los -- antibióticos (28). La presencia de este problema se eviden cia por el gran número de publicaciones científicas provenientes tanto de países industrializados como de aquellos en vías de desarrollo (2,6,7,9,12,13,16,21,26,29,31,32). En El Salvador el S. aureus, por ser uno de los agentes más comunes en la producción de infecciones nosocomiales, ha si do el primero y el más extensamente estudiado en el aspecto de la resistencia bacteriana a los fármacos (1).

En relación al problema de la resistencia a los antimi crobianos presentada por cepas comúnmente aisladas en los centros hospitalarios del país, hasta hace poco había sido poco estudiada. Sin embargo, Alvarez Jiménez y colaboradores (1) trabajando con muestras de pacientes tanto hospitalizados como ambulatorios del ISSS, reportaron que el 95% de cepas de S. aureus eran resistentes a la penicilina, ampicilina y productoras de beta-lactamasa. Estas mismas cepas fueron sensibles a cefalosporina (1).

Otras especies como N. gonorrhoeae, S. pneumoniae y H. influenzae a pesar que se sabe que pueden ser resistentes a los antibióticos betalactámicos (17,18,31,32) no han recibido igual atención, al menos en este país. Por ésto, el presente trabajo se encaminó a revelar cuál es la situación de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos por cepas de estas tres especies bacterianas en particular.

En este estudio dos cepas (4.25%) de 47 estudiadas de N. gonorrhoeae, 1 cepa (2.38%) de 42 de S. pneumoniae y ninguna de H. influenzae de 11 analizadas produjo la enzima. Vale la pena mencionar que los resultados reportados en -- otros países en relación a estos 3 microorganismos difieren de los nuestros. Con relación a N. gonorrhoeae, en Liverpool, las cepas productoras de beta-lactamasa llegaron a constituir en 1976, el 9% de las cepas aisladas (31). En algunas zonas de las Filipinas, para ese mismo año, la prevalencia de cepas productoras de la enzima varió de 30 a 40% (31).

En Bangkok, Brown y colaboradores (7) encontraron 42% de cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasas y en los Estados Unidos, Kilpatrick (18) reportó 53% de cepas de N. gonorrhoeae productoras de beta-lactamasa.

Con relación a S. pneumoniae, las cepas resistentes a múltiples antibióticos se han aislado en Africa del Sur y en los Estados Unidos (17,32). En Denver, Istre y colaboradores

aislaron neumococos resistentes a la penicilina en un 6.9% (16). En la literatura revisada no hemos encontrado reportes de S. pneumoniae productor de beta-lactamasa. La cepa que nosotros encontramos con esa propiedad requirió 7 minutos por el método Yodométrico y 15 minutos por el Acidométrico para producir niveles detectables de la enzima. Es posible que eso se deba a una producción muy escasa de beta-lactamasa o a que la actividad enzimática sea menor que la de otras beta-lactamasas. Ya otros autores han mencionado la heterogeneidad de estas enzimas cuyas propiedades pueden variar según la cepa que las produce (22,25). En todo caso, este hallazgo indica la necesidad de estudiar en mayor número de cepas de S. pneumoniae, la capacidad de producción de beta-lactamasa.

Con respecto a H. influenzae, se ha indicado que en diferentes zonas geográficas existe una creciente frecuencia de cepas productoras de beta-lactamasa, en una proporción que varía del 10 al 35% (32,33). En Dallas, ha habido un constante incremento en la frecuencia con que se aislan estas cepas hasta alcanzar niveles de prevalencia del 22% en la población infantil (29).

Las diferencias entre los resultados de los autores citados y los hallazgos del presente trabajo podrían explicarse, en parte, por las diferencias existentes entre los grupos de individuos estudiados. Por ejemplo, haciendo referencia a

N. gonorrhoeae, Kilpatrick (18) y Brown y colaboradores (7) trabajaron solamente con adultos atendidos en algunos casos, específicamente en clínicas de enfermedades venéreas. Se ha observado que en estos pacientes el hallazgo de cepas resistentes de N. gonorrhoeae es más frecuente. En la presente investigación se trabajó con adultos y con niños provenientes de hospitales de consulta general. Con respecto al S. pneumoniae, el estudio de Istre y colaboradores (16), se --- llevó a cabo sólo con muestras clínicas de sangre y líquido cefalorraquídeo. En el presente trabajo, los cultivos aislados se obtuvieron de diferentes muestras provenientes en la mayoría de casos de infecciones localizadas. En relación a H. influenzae, en uno de los trabajos ya citados (29) se investigó la resistencia de dicha bacteria en especímenes clínicos provenientes únicamente de niños afectados de meningitis y artritis. Nuestra investigación fue hecha, sin embargo, como ya lo mencionamos anteriormente, en adultos principalmente y en niños en menor proporción, con muestras provenientes de infecciones localizadas en la mayoría de los casos. Como se sabe, las infecciones generalizadas usualmente son producidas por cepas de H. influenzae resistentes a los antibióticos beta-lactámicos (14).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que, al menos para el grupo de pacientes estudiados, el problema de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos presentado por ---

las cepas aisladas en este estudio, aparentemente no es --- alarmante y es mucho menor que los resultados reportados en otros países. Sin embargo, podría tener importancia epidemiológica, si tomamos en cuenta que la población en general de nuestro país tiene aproximadamente 4.5 millones de habitantes, la mayoría de ellos con un nivel socio-económico y adquisitivo muy bajo.

Lo discutido arriba es un intento de explicación de las diferencias entre lo observado en este trabajo y los -- trabajos mencionados, pero queda la interrogante del por -- qué estas bacterias han desarrollado resistencia en forma notable a los antibióticos en otras partes del mundo, y no lo han hecho en nuestro país. Una posible explicación es la siguiente: Las cepas en este país no están infectadas por el plasmidio transmisible que transporta el gene determinante de la enzima. El hecho de que la beta-lactamasa sea inducible no es explicación, ya que en El Salvador se usan ampliamente los antibióticos beta-lactámicos que son los inductores de la enzima. Es posible también, que en la actualidad estas bacterias sean potencialmente resistentes y que tengan la habilidad de producir la beta-lactamasa, aunque no lo hayan manifestado todavía en forma alarmante. Apoyando esta posibilidad tenemos el trabajo de Hafiz y colaboradores (13). En 1940, antes del descubrimiento de la penicilina, estos autores encontraron una cepa de

N. gonorrhoeae productora de beta-lactamasa. Esto sugiere que los gonococos tenían el potencial de producir la enzima, al menos desde entonces, pero fue hasta en 1976, debido al uso aumentado de los antibióticos beta-lactámicos (35), que en las Filipinas se reportó por primera vez el aislamiento de gonococos productores de beta-lactamasa y resistentes a la penicilina (7,13,17,20,38).

Algunos investigadores señalan otra posibilidad, al menos para el caso de H. influenzae (6), y es la de encontrar resultados falso negativos debido a la utilización de inóculos demasiado pequeños como para producir cantidades detectables de la enzima, al realizar los procedimientos de laboratorio empleados en este trabajo. En todo caso, todas estas explicaciones no son sino solo especulaciones y cualquiera o ninguna de ellas podría ser válida.

En relación al hecho de que con cierta frecuencia en las bacterias se encuentra resistencia sin asociación aparente a la producción de beta-lactamasa, en este estudio se obtuvo una cepa de N. gonorrhoeae y otra de S. pneumoniae resistentes ambas, a la penicilina y a la ampicilina sin producción de beta-lactamasa (tabla 3). Además, de las 11 cepas investigadas de H. influenzae, 8 cepas presentaron resistencia pero ninguna produjo la enzima (tabla 4). El porcentaje de 72.7% de cepas de H. influenzae resistentes a

N. gonorrhoeae productora de beta-lactamasa. Esto sugiere que los gonococos tenían el potencial de producir la enzima, al menos desde entonces, pero fue hasta en 1976, debido al uso aumentado de los antibióticos beta-lactámicos (35), que en las Filipinas se reportó por primera vez el aislamiento de gonococos productores de beta-lactamasa y resistentes a la penicilina (7,13,17,20,38).

Algunos investigadores señalan otra posibilidad, al menos para el caso de H. influenzae (6), y es la de encontrar resultados falso negativos debido a la utilización de inóculos demasiado pequeños como para producir cantidades detectables de la enzima, al realizar los procedimientos de laboratorio empleados en este trabajo. En todo caso, todas estas explicaciones no son sino solo especulaciones y cualquiera o ninguna de ellas podría ser válida.

En relación al hecho de que con cierta frecuencia en las bacterias se encuentra resistencia sin asociación aparente a la producción de beta-lactamasa, en este estudio se obtuvo una cepa de N. gonorrhoeae y otra de S. pneumoniae resistentes ambas, a la penicilina y a la ampicilina sin producción de beta-lactamasa (tabla 3). Además, de las 11 cepas investigadas de H. influenzae, 8 cepas presentaron resistencia pero ninguna produjo la enzima (tabla 4). El porcentaje de 72.7% de cepas de H. influenzae resistentes a

los dos o a un antibiótico sin producción concomitante de beta-lactamasa es elevado. En la literatura investigada no se encontró algo similar ya que los reportes publican cifras entre 0.41 y 10% de cepas resistentes a los antibióticos sin producción de la enzima (26,30). Aparentemente estos resultados no se deben a la falta de sensibilidad de los procedimientos empleados en este estudio para detectar la enzima, ya que es bien conocido que estos métodos son extraordinariamente sensibles (2,20,21,30). Como posible explicación se puede especular que los cultivos aislados pertenecen a una misma especie que esté infectando a varios individuos. Se cree que éste sea el caso porque dichas cepas fueron aisladas casi todas de niños quienes en su mayoría (7 en total) estuvieron hospitalizados durante el mismo período --- (Agosto-Septiembre de 1983), y en la misma área hospitalaria. Sin embargo, el hecho de que los patrones de resistencia presentados por estos cultivos no fue el mismo, es un argumento en contra de esta posibilidad. Es posible también que en algunas de las especies del género Hemophilus, la resistencia a los antimicrobianos beta-lactámicos no se debe a la producción de enzimas. Un ejemplo notable de este caso lo reporta Oberhofer y colaboradores (30) para H. parainfluenzae. Estos autores encontraron que el 91% de esta bacteria era resistente a la penicilina sin producir la enzima beta-lactamasa. Finalmente, es posible que en to

dos los casos la resistencia se deba a mecanismos intrínsecos, tal como lo describen en su trabajo Sabat y colaboradores (34), quienes afirman que la resistencia intrínseca a la penicilina se presenta tanto en N. gonorrhoeae, como también en S. pneumoniae y H. influenzae. Incluso afirman que la mayoría de H. influenzae no producen ninguna beta-lactamasa aún cuando sean resistentes a los antimicrobianos --- beta-lactámicos. Debe aclararse que las publicaciones pertinentes al tema, que contradicen las afirmaciones de Sabat son muchas (4,5,17,20,26,29). El mecanismo de resistencia intrínseco todavía permanece mal definido o es desconocido (26,34), pero se cree que podría deberse principalmente a una reducción en la permeabilidad celular al antibiótico, o a la ausencia de receptores para la penicilina (17,26), o a síntesis insuficiente del peptidoglican de la pared celular (17,35).

El hallazgo observado con H. influenzae en cuanto a -- que una misma cepa presentaba resistencia a uno de los antibióticos beta-lactámicos utilizados y simultáneamente sensibilidad, al otro (tabla 4), parecen indicar que existen en esa bacteria, probablemente, mecanismos de resistencia diferentes para los dos antibióticos (4,30).

La correlación obtenida entre los dos métodos utilizados para detectar la enzima, fue del 100% en cuanto a sensibilidad y especificidad. Así, los cultivos productores de beta-lactamasa, fueron positivos tanto por el método Acidométrico como por el Yodométrico Rápido en Tira de Papel; -- los cultivos negativos lo fueron por ámbos métodos. Otros investigadores, reportaron resultados iguales a éstos (21, 30).

Los tiempos de reacción requeridos por los procedimientos empleados para la detección de la enzima, fueron similares a los de otros autores en el caso de N. gonorrhoeae (2). Sin embargo, no se pueden hacer comparaciones significativas con otros trabajos debido a que el número de cepas productoras de beta-lactamasa en este estudio fue muy pequeño.

La experiencia en este trabajo fue que los dos procedimientos empleados para detectar la enzima dieron iguales resultados. Sin embargo, al comparar los dos métodos, el Yodométrico Rápido en Tira de Papel lo encontramos más ventajoso, por ser más práctico y económico, ya que el uso de las tiras reactivas facilita la prueba, así como también, el hecho de no necesitar esterilización ni de un pH determinado. El método Acidométrico en cambio, lo encontramos más difícil de realizar porque este método sí necesita la

utilización de un potenciómetro para determinar el pH, además, necesita conservar estériles los reactivos, y que las cantidades de reactivos se utilicen en volúmenes precisos, lo cual implica más trabajo para la realización de la técnica.

Por lo expuesto en el párrafo anterior se concluye que en nuestro medio, dadas las limitaciones económicas y las dificultades para importar reactivos y equipo, la Prueba Yodométrica Rápida en Tira de Papel, resulta ser la más práctica para ser utilizada como prueba de rutina en los laboratorios de microbiología del país.

## C O N C L U S I O N E S

1. Los hallazgos del presente trabajo sugieren que, al menos para el grupo de pacientes estudiados, el problema de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos presentado por las cepas estudiadas, es mucho menor que los resultados reportados en otros países.
2. Los procedimientos Acidométrico y Yodométrico fueron --- igualmente eficaces para la detección de beta-lactamasa producida por N. gonorrhoeae y S. pneumoniae mostrando excelente correlación con los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad a los antibióticos por el método estandarizado de Kirby-Bauer.

## R E C O M E N D A C I O N

Continuar con la realización de estudios referentes al problema de la resistencia bacteriana y producción de beta-lactamasa en cepas de Neisseria gonorrhoeae, Hemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae, para conocer si el problema es estable o presenta variación.

## B I B L I O G R A F I A

1. Alvarez Jiménez, N.S.; Miranda Pineda, V.E.; A.F.A. Investigación de la producción de Beta-Lactamasa por cepas de Staphilococcus aureus con los métodos Acidométrico y Yodométrico Rápido en Tira de Papel. San Salvador, El Salvador, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. 1983. 51p. (Seminario de Graduación mimeografiado).
2. Bae, H.C.; Ledesma, G. and Korzis, J. Analysis of --- Neisseria gonorrhoeae for in situ-B-Lactamase production by reagent impregnated filter paper replica --- methods. J. Clin. Microbiol. 17(3):545-547, 1983.
3. Bailey, W.R. and Scott, E.G. Diagnóstico microbiológico. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos. 3a. Ed. Argentina. Editorial Médica -- Panamericana S.A. 1973.
4. Bell, S.M. and Plowman, D. Mechanisms of Ampicillin Resistance in Hemophilus influenzae from Respiratory tract. The Lancet, i:279-280, 1980.

5. Bell, S.M.; Plowman, D.E.; Burville, L.J. and Mayall, B.C. Genetic variation that switches off and on Beta-lactamase production by Hemophilus influenzae. *Lancet*, 8224 (1): 846, 1981.
6. Boughton, William H. Rapid detection in spinal fluid of Beta-lactamase produced by ampicillin-resistant --- Hemophilus influenzae. *J. Clin. Microbiol.* 15(6):1167-1168, 1982.
7. Brown, S.; Biddle, J.; Warnnissorn, T.; Panikabutra, K.; and Traisupa Amnuay. Antimicrobial resistance of Neisseria gonorrhoeae in Bangkok: is single drug treatment phasse. *Lancet* 8312(2) 1366-1368, 1982.
8. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. and Wood, W.B. *Microbiology*. 3a. Ed. Philadelphia. Harper and Row Publisher, Inc. 117-118, 1980.
9. Enterline, R.B., Althaus, M.M. and Harrell, L.J. Comparison of four products for detection of Beta-lactamase production in Hemophilus influezae, Neisseria gonorrhoeae and Staphilococcus species. *Clinical Microbiology Laboratories*. ASM National Meeting. New Orleans, Louisiana, 1983.

10. Flores Aguilar, F., Fuentes Iraheta, B. Informe de la sensibilidad de las bacterias más frecuentemente aisladas en el hospital Benjamín Bloom, a diversos agentes antimicrobianos en el período comprendido entre Enero 1978 a Diciembre 1979. Revista de la Sociedad de Pediatría de El Salvador. 10(1): 77-85, 1980.
11. García de R., M.E.; Menéndez de M, L. Estudio de 110 casos ingresados en el hospital de niños Benjamín Bloom, durante los años 1975-1976. Revista de la Sociedad de Pediatría de El Salvador, 8(3): 189-195, 1978.
12. Goodman, L.S. and Gilman, A. The Pharmacological basis of Therapeutics. Cap.57. Antimicrob. 5a. Ed. MacMillan Publishing Co., Inc. New York, 1975.
13. Hafiz, S., McEntegart, M.G. and Gooch, Hilary. Did Neisseria gonorrhoeae acquire the ability to produce Beta-lactamase in 1976? Lancet, 8271(1): 558, 1982.
14. Harrison's, T.R. Principles of Internal Medicine, 10a. Ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 1983.
15. Hejna, J.M., Dowley, C.M., Haskett, S.C., Lilli, H.D. and Johnson, R. Detection of Beta-lactamase production in aerobic and anaerobic bacteria. B.B.L. Microbiology Systems, Cockeysville, M.D. 1983.

16. Istre, Gregory R., Humphreys, J.T., Albrecht, K.D., Thornsberry, C. and Swenson, T.M. Chloramphenicol and penicillin resistance in pneumococci isolated from blood and cerebro spinal fluid: a prevalence study in Metropolitan Denver. *J.Clin. Microbiol.* 17(3): 472-475, 1983.
17. Jawetz, Ernest; Melnick, J.L.; Adeberg, E.A. Manual de Microbiología Médica. 9a. Ed. Editorial El Manual Moderno S.A., 1981.
18. Kilpatrick, E.J. and Edwards, E.A. Rapid diagnosis of Beta-lactamase enzyme in penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. Naval Health Res. Ctr. San Diego, California. 1983.
19. Komatsa, Y. and Thoru, N. Moxalactam (6059-s), a new 1-OXA-B-lactam: binding affinity coli K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13(3): 316-321, 1980.
20. Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, J.R.; William J. and Truant, Joseph P. Manual of Clinical Microbiology. 3a. Ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
21. Lee, W.S., and Komarmy, L. Yodometric spot test for detection of Beta-lactamase in Hemophilus influenzae. *J. Clin. Microbiol.* 13(1): 224-225, 1981.

22. Levy, S.B. Microbial resistance to antibiotic. *Lancet*. 8288(2): 83-87, 1982.
23. Linch, M.J.; Raphael, S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D. and Inwood, M.J.H. *Métodos de Laboratorio*. 2a. Ed. México, Nueva Editorial Interamericana, 1969.
24. *Manual de Diagnóstico Bacteriológico*. Depto. de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, 1978.
25. Martin, D.W. *Harper's Review of Biochemistry* 18a. Ed. Lange Medical Publications California, U.S.A. 1981.
26. Markowitz, S.M. Isolation of an Ampicillin-Resistant, non Beta-lactamase-producing strain of Hemophilus influenzae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17(1) 80-83, 1980.
27. MacLean, I.W., H.W.B., and W.L.A. Tem-tipe B-lactamase production in Hemophilus ducreyi. *Antimicrob. agents Chemother.* 17(5): 897-900, 1980.
28. Mendoza Vega, Juan. Para cada germen su antibiótico. *Tribuna Médica*. 32(5): 9-18, 1982.
29. Nelson, J.D. The increasing frequency of B-Lactamase-producing Hemophilus influenzae B.J. *Am.Med, Assoc.* 244(3): 239, 1980.

30. Oberhofer, Thomas R., and Towle, D.W. Evaluation of the rapid penicillinase paper strip test for detection of B-Lactamase. *J.Clin. Microbiol.* 15(2): 196-199, 1982.
31. Oficina Sanitaria Panamericana. Neisseria gonorrhoeae productora de B-lactamasa (Penicilinas). *Boletín*, 84(1): 83-85. 1978.
32. Oficina Sanitaria Panamericana. Distribución mundial de Neisseria gonorrhoeae productora de B-lactamasa. *Boletín*, 92(1): 85-86, 1982.
33. Organización Panamericana de la Salud. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. 13a. Ed. Asociación Americana de Salud Pública, Editores. 1983. (Publicación Científica No. 442).
34. Sabath, L.D. Mechanisms of resistance to Beta-lactam antibiotic in strains of Staphylococcus aureus. *Ann Intern Med.* 97(3): 339-344, 1982.
35. Selwyn, S., Lacey., R.W. and Bakthiar, M. The Beta-lactam Antibiotics: Penicillins and Cephalosporins in perspective. Hodder and Stoughton Ed., London Sydney Auchland, Toronto, 1980.

36. Simpson, I.N., Harper, P.B. and O'Callaghan, C.H.  
Principal B-lactamases responsible for resistance to  
B-lactam antibiotics in urinary tract infections.  
Antimicrob. Agents Chemother. 17(6): 929-936, 1980.
37. Syriopoulou, V., Scheifele, D., Smith, A.L. and Perry,  
P.M. Increasing incidence of Ampicillin Resistance in  
Hemophilus influenzae. J. Pediatr. 92(6): 889-892, 1978.
38. Valverde, Carlos A. Tratamiento de N. gonorrhoeae pro-  
ductora de B-lactamasa, con Rosoxacina. Depto. de Lucha  
Antivenérea del Ministerio de Salud de Costa Rica. ---  
1983 4p.
39. Verschueren, H., Dekegel, D. and others. Plasmids in  
Neisseria meningitidis. Lancet, 8276(1): 851. 1982.
40. Yolken, R.H. and, Hughes, W.T. Rapid diagnosis of in-  
fections caused by B-lactamase producing bacteria by  
means of an enzym Radioisotopic assay. J. Pediatr.  
97(5): 715-720, 1980.