



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



***Investigación de la Producción de Beta Lactamasa  
por Cepas de Staphylococcus Aureus con los  
métodos Acidométrico y Yodométrico Rápido  
en tira de papel***

SEMINARIO DE GRADUACION

PRESENTADO POR

NORA SILVIA ALVAREZ JIMENEZ  
VILMA ELOISA MIRANDA PINEDA  
ANA LILIAN AGUILAR FERNANDEZ

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE

LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

ASESOR

**Dra. LEONOR ISABEL MURILLO DE LINARES**



OCTUBRE DE 1983

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C. A.

T  
616.014  
A473i

INVESTIGACION DE LA PRODUCCION DE BETA LACTAMASA  
POR CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CON LOS  
METODOS ACIDOMETRICO Y YODOMETRICO RAPIDO  
EN TIRA DE PAPEL

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

A Dios Todopoderoso que nos iluminó.

A nuestra asesor, Dra. Leonor Isabel Murillo de Linares, por su estímulo, paciencia y acertada dirección en este trabajo.

Al Dr. Rómulo Sosa Cáceres, Dr. Carlos Flores y T.M. Jaime Soundy, por su valiosa y desinteresada colaboración.

Al Personal de la Sección de Microbiología y Preparaduría del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

Al Personal de Archivo del I.S.S.S.

Y a todas las personas que en una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA

- |                              |                     |
|------------------------------|---------------------|
| A mis padres                 | Con infinito amor   |
| José Manuel Alvarez Bolainez |                     |
| Lidilia Jiménez de Alvarez   |                     |
| <br>                         |                     |
| A mis abuelos                | Con abnegación      |
| José Ramón Jiménez           |                     |
| Arcadia López de Jiménez     |                     |
| <br>                         |                     |
| A mis hermanos               | Con especial cariño |
| José Manuel                  |                     |
| Rosa María                   |                     |
| Gloria Elizabeth             |                     |
| Ligia Deisy                  |                     |
| <br>                         |                     |
| A mi sobrino                 | Con ternura         |
| Manuel Enrique               |                     |
| <br>                         |                     |
| A mi prima                   | Con eterna gratitud |
| Rosa Amelia Juárez Jiménez   |                     |
| <br>                         |                     |
| A mis familiares y amigos    | Con sincero afecto  |

## DEDICATORIA

A:

Mi padre Marco Antonio a quien admiro y agradezco todo lo que ha hecho por mí.

Mi madre Blanca con todo cariño, gracias por todo.

Mi esposo Carlos Eduardo con todo mi amor, le agradezco su comprensión y paciencia.

Mi hija Blanquita con el inmenso amor de siempre.

Mis suegros René y Blanca cariñosamente.

Francisco Argüello y Rosa L. Miranda de Argüello que con su ayuda hicieron posible este trabajo.

Rosita v. de Pineda, Julia Pineda de Chévez y Rosa Marta Guzmán.

## DEDICATORIA

A mis padres

Mario Aguilar Hernández

Teresa Fernández de Aguilar

Con todo amor

A mis abuelitos

Erasmo Aguilar

Sara de Aguilar

Con ternura

A mi hermano

Mario Alberto Aguilar Fernández

Con cariño

A mis familiares y amigos

Con sincero afecto

## I N D I C E

|                        | página |
|------------------------|--------|
| 1. Resumen             | 1      |
| 2. Introducción        | 3      |
| I. Objetivos           | 12     |
| II. Material y Métodos | 13     |
| III. Resultados        | 23     |
| IV. Discusión          | 33     |
| V. Conclusiones        | 44     |
| VI. Bibliografía       | 45     |
| VII. Apéndice          | 49     |

## R E S U M E N

Se estudiaron 500 cepas de Staphylococcus aureus provenientes de pacientes del Hospital General del I. S. S. S. con el fin de investigar - en ellas la producción de beta lactamasa. Los resultados demostraron que el 95% de las cepas fueron productoras de la enzima. Además se determinó que la positividad a beta lactamasa fue similar en los pacientes hospitalizados (96%) y en los ambulatorios (94%).

El tipo de muestra que predominó en pacientes ambulatorios fue la -- del aparato respiratorio, en pacientes hospitalizados las muestras de - piel. (En los recién nacidos lesiones de impétigo).

El porcentaje de positividad de acuerdo al sexo resultó casi igual - en individuos del sexo masculino y femenino (95% y 94% respectivamente). En los recién nacidos el porcentaje de positividad fue 100%.

Se demostró que el Staphylococcus aureus es altamente resistente --- (97%) a penicilina y ampicilina y a la vez productor de beta lactamasa. La resistencia es debida a la presencia de plasmidios, y la amplia diseminación a la selección que provoca el uso indebido de antibióticos. La situación con la cefalosporina, como era de esperarse fue diferente pues la mayoría de cepas fueron sensibles (93%) a pesar de ser productoras - de beta lactamasa.

Los métodos utilizados para la detección de beta lactamasa fueron el acidométrico y el yodométrico rápido en tira de papel. Se observó que



hubo correlación de 100% entre ambos métodos; todas las cepas positivas o negativas en el método acidométrico lo fueron también con el yodométrico.

Se notó que la preparación de materiales y reactivos para el método yodométrico fue fácil, práctica y muy económica. Además, los reactivos fueron estables a la temperatura del congelador del refrigerados ( $-6^{\circ}\text{C}$ ) durante 6 meses. El método acidométrico requiere de material estéril, es más difícil de preparar y el sustrato de penicilina se inactiva después de una semana a  $-6^{\circ}\text{C}$ . Además, el tiempo de reacción de la prueba es más prolongado.

El método yodométrico rápido en tira de papel, por su simplicidad y por proporcionar información en forma rápida sobre la resistencia bacteriana a la penicilina, se recomienda sea verificado con las cepas de -- Staphylococcus aureus en los laboratorios clínicos donde se trabaje bacteriología.

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

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que provoca un serio problema de terapia antimicrobiana, debido a su habilidad para desarrollar diferentes mecanismos de resistencia a las penicilinas y otros antibióticos (23,26,30,31). Estudios hechos en Estados Unidos demuestran que entre el 60-90% de cepas de Staphylococcus aureus son resistentes a la penicilina (6,7).

En general, se considera que el desarrollo de resistencia de las bacterias a los antibióticos es debido a que sufren cambios genéticos hereditarios que van de generación en generación. La alteración del material genético puede ser transferida de unos microorganismos a otros, por diferentes mecanismos. Los cocos gram positivos utilizan los mecanismos de mutación, transformación y transducción y a los bacilos gram negativos se les agrega además el mecanismo de conjugación (7). El desarrollo de resistencia puede ser explicado por los siguientes medios:

1. Que la bacteria elabore una enzima que metabolice el medicamento, por ejemplo, que la bacteria produzca penicilinasas que destruye la penicilina (7).
2. Que la bacteria sufra alteración en su permeabilidad con respecto al medicamento (7).
3. Que exista alguna alteración en la cantidad de receptores de la bacteria para la droga o en la forma como el medicamento se une a la bacteria (7).

En particular, en lo que se refiere al Staphylococcus aureus y su interacción con los medicamentos, se han observado los siguientes fenómenos:

1. Tolerancia. En este caso hay una disociación entre la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la mínima cantidad de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, y la concentración bactericida mínima (CBM), que es la mínima cantidad de antibiótico capaz de matar a la bacteria; esto se manifiesta por un valor alto de la relación CBM/CIM, alrededor de 32 o más (30,31). Fleming en su descripción original de la penicilina notó que la cantidad de antimicrobiano necesaria para inhibir (CIM) y la necesaria para matar (CBM) eran casi iguales o sea que la relación entre CBM/CIM era igual a 1 (30,31). Posteriormente Best y colaboradores (30) demostraron que algunas cepas de Staphylococcus mostraban disociación entre CBM/CIM en referencia a la penicilina. Esto se debe a factores que causan disminución en la actividad de los sistemas autolíticos de esas bacterias, lo cual Sabath y colaboradores (30) han demostrado que es debido a la persistencia de un factor inhibidor de las autolisinas bacterianas. Esto determina que la bacteria no sufra lisis cuando el antibiótico se da en dosis bajas lo que causa ineficacia en la terapia. En la práctica la mayoría de cepas de Staphylococcus aureus presentan una relación CBM/CIM que oscila entre 1 y 4 y relativamente pocas cepas dan una relación cerca de 32, excepto las cepas tolerantes que dan relación de 32 o más (30,31,32). La tolerancia es de carácter inestable. Bradley y asociados han presenta-

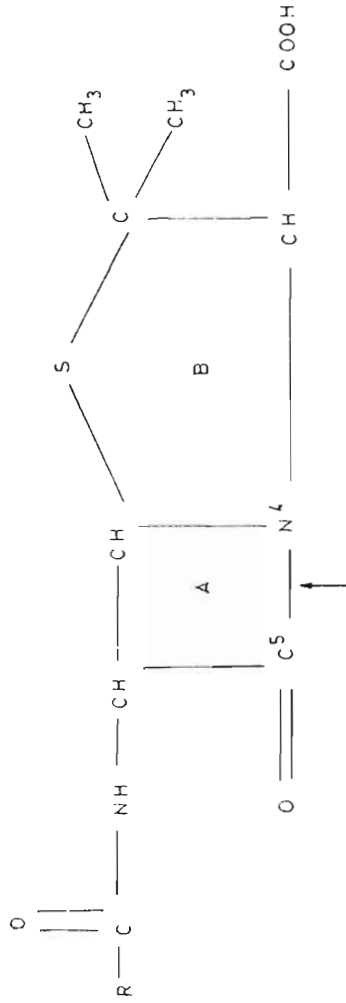
do evidencias de que los bacteriófagos pueden transferir la tolerancia de una cepa a otra (30).

2. Mecanismos intrínsecos. Estos son inherentes a la bacteria y su mecanismo no se conoce bien hasta el momento. Factores físicos y químicos del medio que rodea a la bacteria como: pH, luz, agentes quelantes, acidez y alcalinidad que intervienen en la expresión fenotípica de la resistencia (30,31). Un ejemplo es la resistencia del Staphylococcus a la meticilina.

3. La producción de la enzima beta lactamasa (penicilinas). Inactiva los fármacos betalactámicos antes que estos hayan causado cambios -- irreversibles en la célula bacteriana (30,31). La penicilinas es una enzima que puede ser inducida o constitutiva. En forma inductiva la -- producen diferentes microorganismos como los Staphylococcus, Escherichia coli, Proteus, Pseudomona aeruginosa, Mycobacterium tuberculosis, Bacteroides y varias especies de Bacillus. Esta enzima actúa rompiendo el -- anillo betalactámico del antibiótico entre los átomos de carbono 5 y nitrógeno 4 dando lugar a la formación de ácido peniciloico, quedando inactivado el antibiótico (6,7,24). (Ilustrado en página iv).

El problema de las infecciones hospitalarias se debe a bacterias que habitan en el ambiente o que colonizan al personal del hospital; esas bacterias con frecuencia son resistentes a los antibióticos. Entre ellas son de especial importancia los Staphylococcus resistentes a la penicilina que con frecuencia causan infecciones de heridas, de faringe, lesiones

# ESTRUCTURA DE ALGUNAS PENICILINAS



A. Anillo Beta-lactámico.

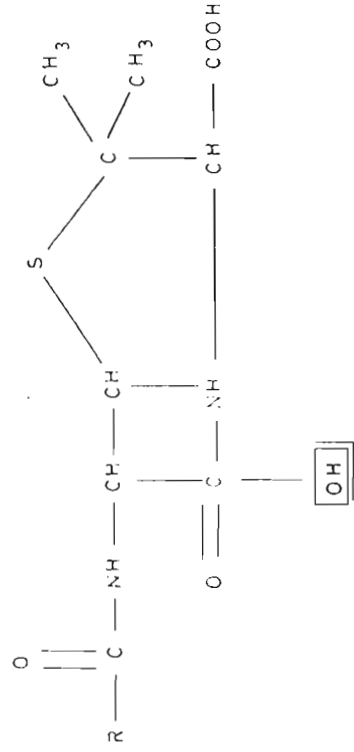
B. Anillo Tiazolidínico.

↑. Sitio de acción de la penicilinasas.

Penicilina

Penicilinasas

Amidasas



Acido peniciloico

Acido 6 Aminopenicilánico

Cadena Lateral (R).

Penicilina

C<sub>6</sub> H<sub>5</sub> CH<sub>2</sub>

Benzil (G)

C<sub>6</sub> H<sub>5</sub> OCH<sub>2</sub>

Fenoximetilo (V)

cutáneas y otros tipos de infecciones (6,27). Se ha demostrado que algunos de los Staphylococcus responsables de enfermedades hospitalarias -- son cepas correspondientes a los grupos I y III bacteriofágico (6). -- Probablemente esto se debe a que sintetizan la penicilinasa A y C que tienen alta eficiencia fisiológica. Las infecciones intrahospitalarias producidas por el Staphylococcus son de mucho interés e importancia, -- porque con frecuencia se desarrollan en individuos con otros procesos -- patológicos subyacentes, a consecuencia de los cuales tienen deprimida sus defensas inmunológicas y alterado su estado nutricional (28).

La demostración de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, cuyos resultados sirven de guía para la elección del medicamento adecuado para combatir al microorganismo causante de la infección, es extraordinariamente importante para iniciar una terapia efectiva que evite que los microorganismos produzcan lesiones o cambios fisiológicos irreversibles (4,22).

Entre los métodos que se usan para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a los quimioterápicos están:

1. El método de dilución seriada en tubo.
2. El método de dilución en placa.
3. El método de difusión en placa de agar con discos (método del -- disco de Kirby-Bauer) (3).

Cada método tiene sus ventajas y desventajas; pero el que tiene mayor aceptación es el método de difusión con discos (Kirby-Bauer) pues

es simple, reproducible y los resultados ofrecen buena correlación con la concentración inhibitoria mínima (4). Estos métodos se utilizan para evaluar la susceptibilidad a varios antibióticos, entre ellos las penicilinas y cefalosporinas. Existen también otros métodos para detectar en forma indirecta el potencial de presentar resistencia a los antibióticos beta-lactámicos (penicilina G, ampicilina y cefalosporina) que pueden tener algunas bacterias (Staphylococcus, E. coli). Entre ellos están el método cromogénico con cefalosporina, el método acidométrico y el método yodométrico (17).

1. El método cromogénico con cefalosporina, se basa en el viraje de color del amarillo al rojo al poner en contacto una cefalosporina cromogénica (nitrocefín) con una bacteria productora de beta lactamasa (5). Este método tiene las ventajas de que el sustrato es estable por varias semanas a temperatura de refrigeración, que el tiempo de reacción de la prueba es rápida (10 minutos) y que se realiza a temperatura ambiente. Sin embargo, los reactivos son caros y difíciles de obtener (17).

2. El método acidométrico, consiste en la producción de un viraje del color del indicador rojo de fenol que vira de rojo a amarillo al reaccionar una suspensión de bacterias productoras de penicilinas con el sustrato que contiene penicilina G sódica y rojo de fenol como indicador. La ruptura del anillo betalactámico da lugar a la producción de ácido peniciloico que acidifica el pH de la solución de penicilina y causa el cambio de color del indicador (17). Este método utiliza materiales baratos y fáciles de adquirir. Detecta la enzima en todos los

microorganismos que la producen y la pigmentación de las colonias no altera los resultados (17). Tiene como desventajas que es un tanto difícil la preparación de los reactivos siendo necesario ajustar cuidadosamente el pH y mantener la esterilidad de los reactivos. El sustrato debe almacenarse a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3. El método yodométrico, consiste en la interferencia de la enzima beta lactamasa en la interacción del almidón con el yodo. La interacción química de una solución de almidón y penicilina con yodo da lugar a la formación de un complejo de color morado. Al agregar a esta mezcla una suspensión de bacterias productoras de penicilinas, ésta actúa sobre la penicilina produciendo el ácido peniciloico, el cual reduce el yodo a yoduro. Este último no reacciona con el almidón, por consiguiente no hay más formación de complejo morado y desaparece el que ya está formado, observándose una decoloración de la solución. El método yodométrico es muy sensible y confiable. Con el propósito de simplificarlo se han hecho varias modificaciones a ese método en las que se usan los mismos reactivos, pero impregnados en tiras de papel filtro (16,24). - El método rápido yodométrico en tira de papel se ha utilizado para detectar la beta lactamasa producida por las cepas de Staphylococcus, Neisseria, y Haemophilus. Tiene las ventajas de que no necesita que se ajuste pH y la esterilidad no es un factor indispensable para realizarlo. Las tiras de papel son estables por más de un año a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta prueba puede ser realizada inmediatamente después del aislamiento de la bacteria y requiere un pequeño inóculo. Se pueden realizar de 6 a 8 pruebas en



una misma tira (24). Las tiras de papel son fáciles de preparar y los reactivos son económicos (24). En algunos casos la pigmentación dorada intensa del Staphylococcus aureus dificulta la interpretación de los resultados.

4. Existen otras pruebas como el ensayo radioisotópico que utiliza penicilina marcada con el isótopo C-14. Este método detecta a la penicilinas directamente en los líquidos corporales, no requiere del aislamiento de la bacteria para su detección. Su desventaja es que ocupa equipo sofisticado y caro (33).

#### JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, así como la gran mayoría de hospitales de El Salvador enfrentan el problema de las infecciones nosocomiales, con frecuencia causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (19,20). Esas infecciones son causa de prolongación de la estancia intrahospitalaria de los pacientes o inclusive de su muerte. Con frecuencia son debidas a Staphylococcus aureus resistentes a la penicilina (7).

Nuestro interés al realizar este trabajo fue aplicar algunas de las técnicas existentes para detectar la producción de beta lactamasa, a los Staphylococcus aureus que se aislen de las muestras clínicas envia

das al laboratorio del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social. Para esto se usaron los procedimientos acidométrico y yodométrico para determinar la prevalencia de cepas de St. aureus aisladas de las muestras clínicas enviadas al Hospital del I. S. S. S. productoras de la enzima beta lactamasa entre los pacientes intra y extra-hospitalarios de este centro. Además se proyectó estudiar la resistencia de esas cepas a los antibióticos beta lactámicos utilizando el procedimiento de Kirby-Bauer, correlacionando ese dato con la capacidad de producción de beta lactamasa. Además se evaluó cual de las técnicas es más factible que sea realizada como procedimiento de rutina en los laboratorios clínicos que posean facilidades para trabajar en bacteriología.

## I. O B J E T I V O S

1. Determinar la frecuencia de producción de beta lactamasa en 500 - cepas de Staphylococcus aureus aisladas de diferentes muestras clínicas cultivadas en el laboratorio del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social de San Salvador.

2. Comparar la prevalencia de Staphylococcus productores de beta lactamasa en pacientes hospitalizados y ambulatorios atendidos por el laboratorio clínico del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

3. Estudiar la susceptibilidad del Staphylococcus aureus a 3 antibióticos beta lactámicos (penicilina, ampicilina y cefalosporina) y correlacionar esos resultados con la producción de beta lactamasa de esas cepas.

4. Evaluar la eficiencia del método acidométrico y del método yodométrico rápido en tira de papel para detectar la enzima beta lactamasa y la factibilidad de poder aplicarlos en los Hospitales de El Salvador.

## II. MATERIAL Y METODOS

### Cepas de Staphylococcus aureus estudiadas.

Se estudiaron 500 cepas de Staphylococcus aureus provenientes de diferentes muestras clínicas (ver Tabla I pag.11) obtenidas de 235 pacientes hospitalizados y 265 ambulatorios aisladas en la Sección de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital General del Instituto -- Salvadoreño del Seguro Social. Para la identificación de cada cepa se hizo la coloración de gram, la prueba de coagulasa y la prueba de fermentación del manitol (3). Una vez identificada la cepa, a partir de un cultivo puro se verificó la prueba de susceptibilidad a la penicilina, ampicilina y cefalosporina por el método de difusión en agar de Kirby Bauer (3), también se detectó la producción de beta lactamasa por los métodos acidométrico y yodométrico rápido en tira de papel.

Se tomaron datos de los pacientes de quienes provenían las muestras, utilizando un formulario preparado con ese propósito, del cual se adjunta un ejemplar (ver pag. 10).

1. Coloración de Gram (3).
2. Prueba de coagulasa en tubo.

Se colocó en un tubo pequeño 0.5 cc de plasma citratado de conejo diluido 1:5. Se mezcló con una asada de la bacteria en estudio. Cuando la bacteria producía coagulasa esta reaccionaba con el plasma (con la protombina o un derivado) y se producía una sustancia que no se distin-

que de la trombina y hace que el fibrinógeno pase a fibrina produciéndose el coagulo. La coagulación total o parcial se considera positiva y se lee a las 4 horas. Se hace con cultivos puros para evitar falsas positivas (6). Esta prueba en tubo mide la coagulosa libre que producen los Staphylococcus aureus, es mejor y más exacta que la prueba de la coagulasa en lámina. La prueba de la coagulasa se usa como criterio de patogenicidad para diferenciar al Staphylococcus aureus del Staphylococcus epidermidis, pero existen algunas cepas mutantes de St. aureus que dan esta prueba negativa (3,6).

### 3. Prueba de fermentación del manitol.

La fermentación del manitol es característica de los microorganismos patógenos positivos a la coagulasa. El medio contiene manitol el cual es fermentado por algunas bacterias; contiene un indicador cuyo cambio de color morado a amarillo indica que la bacteria ha producido ácido por fermentación del azúcar (3).

### 4. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos con el método del disco (Kirby-Bauer).

a) se midieron 12 ml. del medio Mueller Hinton en tubos de ensayo se esterilizó y se vertió en cajas de petri estériles (de 100 mm de diámetro) logrando un espesor aproximado de 4 a 5 mm.

b) Se estandarizó el inóculo disolviendo de 4-5 colonias con características iguales en 0.5 ml. de solución salina estéril utilizando un tubo de ensayo, luego incubamos a 37°C durante 3 a 4 horas hasta que obtuvimos una turbidez semejante al tubo número 4 de la escala McFarland.

c) Se impregnó un hisopo con el inóculo y se rotó en las paredes del tubo para quitar el exceso, luego se sembró en forma homogénea sobre el medio Mueller Hinton.

d) Se colocaron los discos de penicilina, ampicilina y cefalosporina (cefaloridina de la casa DIFCO). Sobre el medio y se incubaron las placas a 37°C por 18-24 horas.

e) Se leyeron las zonas de inhibición alrededor de cada disco tomando como susceptibles aquellas cepas que dieron una zona de inhibición con diámetro mayor de 29 mm. o más para penicilina, 29 mm. o más para ampicilina y de 18 mm. o más para cefalosporina (3).

## 5. Método rápido acidométrico para detección de beta lactamasa.

### 5-1 Técnicas

a) Se prepararon en pocitos de microcubetas una suspensión espesa de colonias de un cultivo puro de Staphylococcus aureus aislado recientemente con 0.05 ml. de solución salina estéril, hasta que se obtuvo una suspensión más turbia que el tubo número 4 de la escala McFarland.

b) Se agregaron 0.05 ml. del sustrato que contiene penicilina G sódica y rojo de fenol.

c) Las bacterias productoras de beta lactamasa cambiaron el color del medio de rojo a amarillo. Se observaron por 4 horas antes de concluir que el resultado era negativo.

### 5-2 Preparación del sustrato.

a) El contenido de un frasco vial de penicilina G sódica de 20 millones de U/I, designada para uso parenteral, que contiene citra-

to buffer se mezcló con 16.6 ml. de agua destilada estéril.

b) Se agregaron 2 ml. de rojo de fenol al 0.5%, esto sirvió como indicador.

c) Se ajustó el pH del sustrato a 8.5 agregándole hidróxido de sodio 1 M, al lograr ese pH tomó color violeta que luego pasó a rojo. Se confirmó el pH del sustrato en un potenciómetro. En la Figura 1 en la página 8 se ilustra el aspecto de una reacción positiva y negativa a la penicilinas detectada por el método acidométrico.

## 6. Método yodométrico rápido en tira de papel.

### 6-1 Técnica

a) Una tira de papel filtro se impregnó con penicilina G potásica y almidón y se dejó secar. Luego se agregó lugol, hasta que tomó color morado y se dejó escurrir.

b) Con un aplicador de madera limpio (no necesariamente estéril), se tomó el inóculo del medio de cultivo y se esparció sobre la tira en un área circular de 5 mm. de diámetro aproximadamente.

c) La bacteria productora de betalactamasa decoloraba el sitio -- donde se había depositado el inóculo. Se tomó esta reacción como una prueba positiva.

Si el área del inóculo permanecía de color morado o amarillo se consideraba la prueba como negativa lo cual indicaba que la bacteria no producía la beta lactamasa. Se observaron hasta por 4 minutos antes de considerar el resultado como negativo.

## 6-2 Reactivos

a) Lugol de gram: cristales de yodo 1 gr.

yoduro de potasio 2 gr.

Se disolvió completamente en 5 ml. de agua destilada y se agregó agua destilada 240 ml.

Bicarbonato de sodio al 5% 60 ml.

Se mezcló bien; se guardó en un frasco de vidrio de color ámbar (3).

b) Solución de almidón. Se pesó en balanza analítica 0.1 gr. de almidón calidad reactivo y se colocó en un tubo de ensayo con tapón, luego se agregaron 45 ml. de agua desmineralizada estéril. Se calentó a fuego medio durante 30 minutos, moviendo constantemente, tratando de disolver el almidón. Luego se dejó la solución a temperatura ambiente para que se enfriara.

c) Solución de penicilina. Se disolvió un vial de penicilina G - potásica de 1 millón de U/I con 9.6 ml. de agua bidestilada así se logró una concentración de 100.000 U/ml.

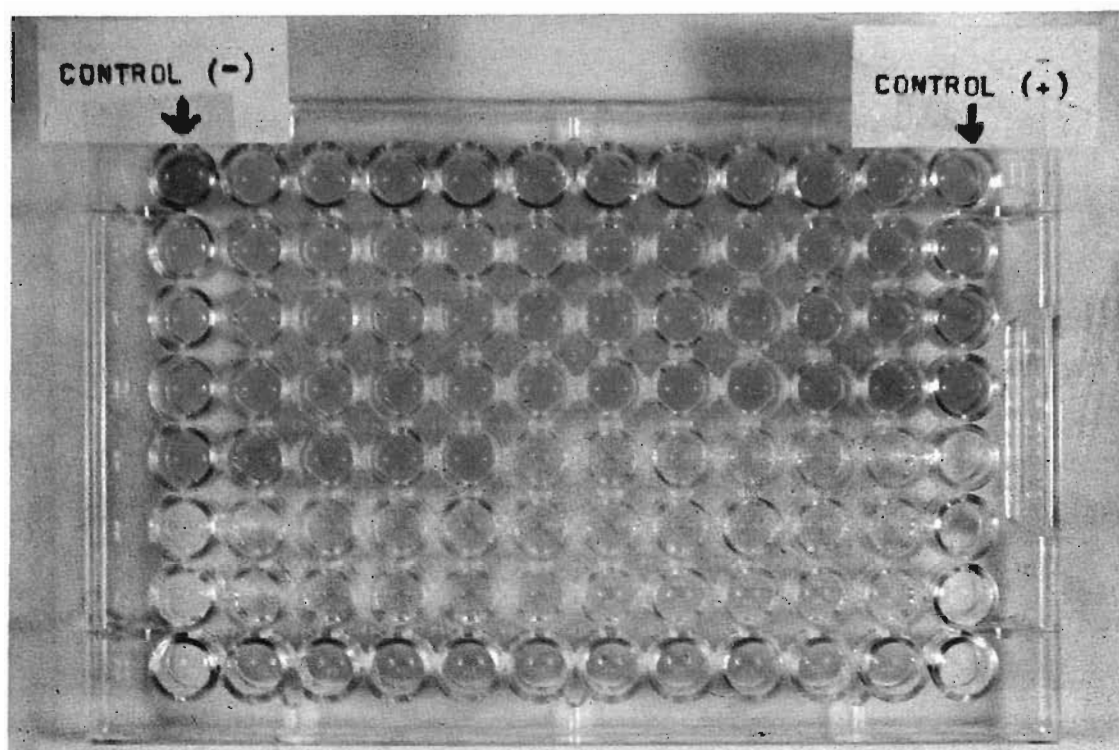
d) Preparación de la mezcla de penicilina y almidón. Se agregaron 5 ml. de la solución de penicilina ya preparada a la solución de almidón y se movió hasta obtener una solución homogénea, cuya concentración final es de 10.000 U/ml.

e) Preparación de las tiras. 1) Se marcaron con un lápiz, tiras de 5 cm. de largo por 1 cm. de ancho aproximadamente, del papel filtro Whatman número 3 (25 cm. por 25 cm.); 2) Se impregnaron las tiras de papel con la mezcla de penicilina-almidón, una por



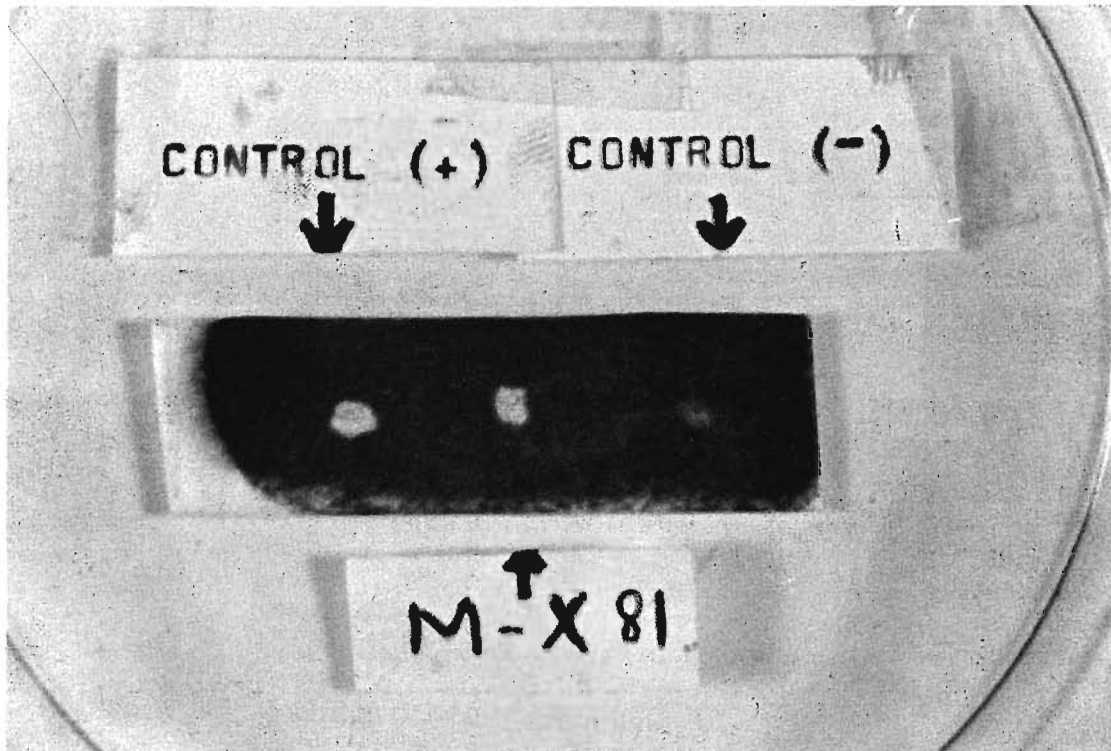
una; 3) Se dejaron secar a temperatura ambiente por dos horas, sobre un plástico grande colocado sobre una mesa; 4) Las tiras impregnadas y secas se guardaron en recipientes herméticos, con preservativos absorbentes de humedad y se mantuvieron en congelación en el congelador del refrigerador (temperatura  $-6^{\circ}\text{C}$ ). En la Figura 2 en la página 9 se ilustra el aspecto de una reacción positiva y negativa a la penicilinasasa detectada por el método yodométrico.

Figura 1. Ilustración del método acidométrico para la detección de beta lactamasa producidas por cepas de Staphylococcus aureus. \*



\* En el extremo superior izquierdo se muestra una cepa no productora de penicilinas. En el extremo superior derecho se muestra una cepa productora de penicilinas. Obsérvese el viraje del indicador en el caso de las cepas productoras de penicilinas. Los otros pocitos de la microcubeta contienen también cepas productoras de penicilinas.

Figura 2. Ilustración del método yodométrico rápido en tira de papel para la detección de beta lactamasa producida por cepas de Staphylococcus aureus. \*



- \* En el extremo izquierdo de la tira se muestra una cepa productora de penicilinas. En el centro de la tira se muestra una cepa (M-X 81) - productora de penicilinas. En el extremo derecho de la tira se muestra una cepa no productora de penicilinas.



# Instituto Salvadoreño del Seguro Social

3a. CALLE PONIENTE 1232 • SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C. A. • APDO. POSTAL 1404  
TELE. 21-7530 • 22-6000

JUNIO DE 1983

HOJA DE COLECCION DE DATOS DE PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DE INFECCIONES  
POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS, LABORATORIO CLINICO DEL ISSS.

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

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

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

Número de cama: \_\_\_\_\_

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: SI

NO

Tipo de tratamiento recibido: \_\_\_\_\_

Infección ha sido adquirida fuera o dentro del Hospital? : \_\_\_\_\_

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

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

Duración del tratamiento : \_\_\_\_\_

Respondió al tratamiento intrahospitalario : SI

NO

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

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

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

mtl/.

## T A B L A I

Origen y diferentes tipos de muestras clínicas obtenidas de 500 pacientes intra y extrahospitalarios.

| Origen de la muestra    | Tipo de muestra      | # de muestras de cada tipo | Totales |
|-------------------------|----------------------|----------------------------|---------|
| Aparato respiratorio    | Secreción faríngea   | 160                        | 253     |
|                         | Secreción nasal      | 65                         |         |
|                         | Espujo               | 22                         |         |
|                         | Secreción bronquial  | 3                          |         |
|                         | Traqueotomía         | 3                          |         |
| Aparato genito-urinario | Secreción vaginal    | 10                         | 75      |
|                         | Secreción uterina    | 10                         |         |
|                         | Secreción uretral    | 14                         |         |
|                         | Semen                | 8                          |         |
|                         | Orina                | 33                         |         |
| Líquidos de derrame     | Líquidos             | 2                          | 4       |
|                         | Secreción páncreas   | 1                          |         |
|                         | Secreción punción    | 1                          |         |
| Piel                    | Úlcera               | 10                         | 139     |
|                         | Escaras              | 2                          |         |
|                         | Escamas              | 4                          |         |
|                         | Secreción absceso    | 80                         |         |
|                         | Pústula              | 7                          |         |
|                         | Secreción herida     | 32                         |         |
|                         | Omblijo              | 2                          |         |
|                         | Circuncisión         | 1                          |         |
| Episiotomía             | 1                    |                            |         |
| Sistema hematopoyético  | Médula ósea          | 2                          | 18      |
|                         | Sangre               | 16                         |         |
| Otros                   | Cateter hemodiálisis | 3                          | 11      |
|                         | Secreción ocular     | 4                          |         |
|                         | Secreción oído       | 1                          |         |
|                         | Heces                | 2                          |         |
|                         | Secreción mama       | 1                          |         |
|                         |                      |                            | 500     |

### III. RESULTADOS

Casi la totalidad de las cepas, 95%, o sea 475 de las 500 cepas de Staphylococcus aureus estudiadas, fueron productoras de beta lactamasa. Solamente el 5% de ellas fueron negativas (Tabla II). Todas ellas fueron aisladas de pacientes atendidos en el Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, 265 pacientes ambulatorios y 235 pacientes hospitalizados. Como puede apreciarse en la tabla los porcentajes de positividad fueron casi iguales en ambos grupos; 94% en pacientes ambulatorios y 96% en pacientes hospitalizados.

En la Tabla III, vemos la distribución de las cepas de Staphylococcus aureus estudiadas según la clase de muestra. Puede apreciarse que el número de muestras del aparato respiratorio predominan en los pacientes ambulatorios; entre éstas se incluyeron las secreciones faríngeas (las que resultaron en mayor número), las secreciones nasales, esputos, etc. En los pacientes hospitalizados la muestra que predominó fué de piel, las cuales provenían en su mayoría de abscesos, infecciones de heridas, úlceras, etc., y en los recién nacidos de impétigo.

Los porcentajes de positividad fueron similares en todos los tipos de muestras estudiadas, excepto en los líquidos de derrame, por ejemplo, los pacientes ambulatorios resultaron con un 93% de positividad en las muestras del aparato respiratorio y con 97% de positividad en muestras del aparato genitourinario y de piel. Los pacientes hospitalizados tuvieron 96% de positividad en muestras de piel y 100% en muestras del aparato res

piratorio. El porcentaje más bajo (86%) se observó en las muestras del aparato genitourinario de pacientes hospitalizados. No hubo diferencia significativa en los porcentajes de positividad de las diferentes muestras en los pacientes hospitalizados y ambulatorios, excepto en los líquidos de derrame y en las muestras del aparato genitourinario en las cuales se observó una mayor positividad para pacientes ambulatorios --- (97%) que para hospitalizados (86%).

En la Tabla IV, se comparan los porcentajes de positividad de acuerdo al sexo. La positividad fué igual en muestras provenientes de individuos del sexo masculino y del sexo femenino 95% y 94%, respectivamente. En el grupo de los recién nacidos no se ha especificado el sexo porque en el Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social al enviar las muestras de esos pacientes no se especifica el sexo. En este grupo evidentemente no hubo diferencia tampoco, ya que el 100% de -- las muestras fueron positivas a beta lactamasa.

En la Tabla V, se presenta la correlación entre la producción de beta lactamasa y la sensibilidad a tres antimicrobianos beta-lactámicos (penicilina, ampicilina y cefalosporina). Puede observarse que la mayoría de cepas estudiadas fueron resistentes a penicilina y ampicilina y que hubo una alta correlación entre la resistencia a penicilina y producción de beta lactamasa (97%), así como entre la resistencia a ampicilina y producción de beta lactamasa (97%). La mayoría de cepas sensibles a penicilina y ampicilina fueron no productoras de beta lactamasa (92%). - La situación como era de esperarse fue diferente con cefalosporina ya -

que la gran mayoría de cepas estudiadas fueron sensibles a pesar de ser también en su mayoría productoras de beta lactamasa (93%), solo 7% de las cepas productoras de beta lactamasa fueron también resistentes.

En la Tabla VI, se presenta una comparación de los métodos utilizados en la determinación de la producción de beta lactamasa; se observa que hubo correlación de un 100% entre los métodos empleados, ya que todas las cepas positivas por el método acidométrico lo fueron también -- por el yodométrico y todas las negativas lo fueron con ambos métodos.

En la Tabla VII, se presenta la comparación del tiempo requerido para detectar la producción de beta lactamasa producida por el Staphylococcus aureus con los métodos acidométrico y yodométrico. El método yodométrico requirió menos tiempo para dar una reacción visible, el 96% de las muestras fueron positivas antes de dos minutos; el tiempo mínimo fue de 10 segundos y el máximo de 4 minutos. Con el método acidométrico la mayoría de las cepas dieron resultados positivos antes de 30 minutos (62%), pero hubo un número apreciable que requirió de 1 a 2 horas (32%); el tiempo mínimo fue de dos minutos y el máximo de cuatro horas.

Los reactivos de ambas pruebas fueron preparados en la Sección de Preparaduría del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social. La preparación de los reactivos para el método acidométrico es un poco fastidiosa, pues todo el material debe ser estéril, las cantidades son pequeñas y requieren de balanza analítica para medir su peso, el pH debe ajustarse con extremo cuidado, y para conservar los reactivos por lo menos dos meses se requiere de un congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$ ; en



el congelador del refrigerador el reactivo se deteriora en menos de una semana. Como contraste, la preparación de materiales y reactivos para el método yodométrico es bastante sencilla, incluso se pueden preparar en casa ya que no es necesario el uso de material estéril ni equipo sofisticado; solo para pesar el almidón (0.1 gm.) se requiere de balanza analítica. Los reactivos pueden conservarse a la temperatura del congelador del refrigerador ( $0^{\circ}\text{C}$  a  $-6^{\circ}\text{C}$ ) por lo menos durante 6 meses.

T A B L A II

Resultados de las pruebas acidométrica y yodométrica para detección de la beta lactamasa en 500 cepas de Staphylococcus aureus aisladas de -- 265 pacientes ambulatorios y 235 hospitalizados.

| Clase de pacientes | Prueba de Beta lactamasa |    |          |   | Total Estudiados | Total % |
|--------------------|--------------------------|----|----------|---|------------------|---------|
|                    | Positiva                 | %  | Negativa | % |                  |         |
| Ambulatorios       | 249                      | 94 | 16       | 6 | 265              | 100%    |
| Hospitalizados     | 226                      | 96 | 9        | 4 | 235              | 100%    |
| Total              | 475                      | 95 | 25       | 5 | 500              | 100%    |

T A B L A III

Distribución de cepas de Staphylococcus aureus según positividad a beta lactamasa, tipo y origen de las muestras y procedencia de los pacientes ( ambulatorios y hospitalarios ).

| Tipo de muestra        | Ambulatorio |       | %   | Hospitalario |       | %   |
|------------------------|-------------|-------|-----|--------------|-------|-----|
|                        | +           | Total |     | +            | Total |     |
| Aparato respiratorio   | 182         | 196   | 93  | 57           | 57    | 100 |
| Aparato genitourinario | 34          | 35    | 97  | 35           | 40    | 86  |
| Líquidos de derrame    | 0           |       | 0   | 4            | 4     | 100 |
| Piel                   | 29          | 30    | 97  | 105          | 109   | 96  |
| Sistema Hematopéyico   | 3           | 3     | 100 | 15           | 15    | 100 |
| Otros                  | 1           | 1     | 100 | 10           | 10    | 100 |
| Total                  | 249         | 265   | 94  | 226          | 235   | 96  |

T A B L A IV

Distribución de la población estudiada según sexo y producción de beta lactamasa.

| Sexo          | Productor de Penicilinas |       | %   |
|---------------|--------------------------|-------|-----|
|               | +                        | Total |     |
| Masculino     | 222                      | / 233 | 95  |
| Femenino      | 235                      | / 249 | 94  |
| Recién Nacido | 18                       | / 18  | 100 |
| Total         | 475                      | / 500 | 95  |

## T A B L A V

Correlación entre la sensibilidad y resistencia a los antibióticos beta - lactámicos y producción de beta lactamasa.

| Producción<br>Beta- lactamasa | Penicilina        |      | Ampicilina |      | Cefalosporina |     | Total de<br>Cepas |
|-------------------------------|-------------------|------|------------|------|---------------|-----|-------------------|
|                               | S*                | R*   | S          | R    | S             | R   |                   |
| Positivo                      | 14                | 461  | 16         | 459  | 442           | 33  | 475               |
|                               | (3) <sup>1</sup>  | (97) | (3)        | (97) | (93)          | (7) | (100)             |
| Negativo                      | 23                | 2    | 23         | 2    | 23            | 2   | 25                |
|                               | (92) <sup>2</sup> | (8)  | (92)       | (8)  | (92)          | (8) | (100)             |
| Total                         | 37                | 463  | 39         | 461  | 465           | 35  | 500               |
|                               | (7) <sup>3</sup>  | (93) | (8)        | (92) | (93)          | (7) | (100)             |

\* S y R = significan sensibles y resistentes respectivamente.

1 Los números en paréntesis corresponden a porcentajes en relación al total de las muestras positivas ( 475 ).

2 Los números en paréntesis corresponden a porcentajes en relación al total de las muestras negativas ( 25 ).

3 Los números en paréntesis corresponden a porcentajes del total de muestras estudiadas ( 500 ).

T A B L A VI

Producción de beta lactamasa en cepas de Staphylococcus aureus y correlación de técnicas acidométrica y yodométrica en tira de papel.

| Método Acidométrico<br>y<br>Método yodométrico | Número<br>de<br>cepas | %   |
|--|-----------------------|-----|
| Positivas                                      | 475                   | 95  |
| Negativas                                      | 25                    | 5   |
| Total  | 500                   | 100 |

T A B L A VII

Comparación del tiempo requerido para detectar la reactividad de la beta lactamasa producida por Staphylococcus aureus con la técnica yodométrica y acidométrica.

| Tiempo<br>seg. minutos horas | Método Yodométrico<br>% de muestras | Método Acidométrico<br>% de muestras |
|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 10 2                         | 96                                  |                                      |
| 2 4                          | 4                                   |                                      |
| 2 30                         |                                     | 62                                   |
| 1 2                          |                                     | 32                                   |
| 2 4                          |                                     | 6                                    |
|                              | * 100                               | * 100                                |

\* El 100% está calculado en base a 475 cepas de Staphylococcus aureus positivas a la producción de beta lactamasa.

## VI. DISCUSION

Los resultados de este trabajo demuestran que un alto porcentaje de las cepas de Staphylococcus aureus aisladas de las muestras clínicas de pacientes del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social son productoras de beta lactamasa; 475 cepas resultaron positivas de un total de 500, representando un 95%. La explicación del por qué de ese alto porcentaje de positividad en la producción de esa enzima, capaz de hidrolizar a los antibióticos beta lactámicos, posiblemente sea el uso amplio y muchas veces indiscriminado que ha tenido la penicilina desde 1940 en el campo de la medicina, lo que ha sido la causa de la selección de cepas mutantes resistentes a penicilina que aunque ya existían, no eran prevalentes (10,18,22).

Anteriormente a la realización de este estudio en nuestro país, se desconocía cuál era el comportamiento de las cepas de St. aureus en -- cuanto a producción de beta lactamasa y por derivación de la resistencia -- de estas mismas cepas a los antibióticos beta lactámicos. Sin embargo, podemos asumir que era muy similar a lo observado en otros países. Por ejemplo, Murray y colaboradores (23) realizaron un análisis retrospectivo de la sensibilidad del Staphylococcus aureus en la ciudad de Boston. Estos autores demostraron que antes de 1946, 82% de las cepas de St. aureus eran sensibles a menos de 0.04 µg/ml y en 1951 el 73% eran resistentes a más de 25 µg/ml y productoras de penicilinas. También notaron que durante muchos años la frecuencia de resistencia de las cepas de St. aureus



aisladas en hospitales era mayor que la de las cepas adquiridas en la comunidad, pero ya en 1967 la resistencia era igual aproximadamente (84%) en las cepas hospitalarias y extrahospitalarias; esa resistencia se mantuvo en 83% para las cepas de pacientes ambulatorios y 84% para los pacientes hospitalizados. Similarmente, otros investigadores reportaron resultados muy parecidos a los de Murray no solo con la penicilina sino que también con la tetraciclina (25). La resistencia del St. aureus a la penicilina es debida en la mayoría de los casos, a la producción de beta lactamasa, la cual es mediada por un plasmidio que se ha demostrado que puede ser transferido por transducción entre bacterias de la misma especie y de otras especies (11, 18). En la actualidad la mayoría de las cepas hospitalarias de estafilococos transportan plasmidios con genes de producción penicilinasas (11,18) y se ha encontrado que la resistencia de los estafilococos virulentos no solo a la penicilina sino que también a la eritromicina y otros agentes antimicrobianos está determinada por plasmidios (11,12,23). Aunque la producción de beta lactamasa no aumenta la virulencia del Staphylococcus, el hecho de que los hace resistentes a la penicilina, que es uno de los antibióticos menos tóxicos, más baratos y más utilizados para el tratamiento de los procesos infecciosos, causa serios problemas terapéuticos, de mayor importancia aún en los pacientes hospitalizados que usualmente tienen otros procesos patológicos que deprimen sus mecanismos inmunológicos (22).

En este estudio se encontraron porcentajes prácticamente iguales de producción de beta lactamasa en St. aureus aislados de pacientes ambulatorios (94%) y de los hospitalizados (96%). Resultados un poco más bajos que los nuestros reportó Murray en 1967 y 1975 con las cepas de ---

Staphylococcus aisladas en Boston y concluye que sus datos son el corolario de un fenómeno dinámico iniciado con la selección de cepas hospitalarias productoras de beta lactamasa observado ya en 1951 que posteriormente se diseminaron a la comunidad en 1967. Es posible que este fenómeno se haya producido también en nuestro medio, favorecido por el amplio uso de las penicilinas en los ambientes intra y extrahospitalarios (12,18,23).

En 1950, Allwood y colaboradores (1), realizaron un estudio en el Hospital de Maternidad de San Salvador en el cual comentaron su preocupación ante la persistencia de infecciones causadas por estafilococos. A pesar de que los progresos de la medicina han logrado un dominio efectivo sobre gran número de enfermedades infecciosas, algunas infecciones por gérmenes virulentos y resistentes a sulfas y antibióticos se han mantenido incontroladas en muchos lugares, y comentan que el ambiente hospitalario es el foco donde estas infecciones se originan y por ello se les ha designado con término genérico de "infecciones hospitalarias".

El problema de la aparición de un gran número de cepas de St. aureus beta lactamasa positivas en los hospitales plantea la realidad de la poca eficacia que el tratamiento inicial o definitivo con penicilinas podría tener para los pacientes con infecciones estafilocócicas. Sin embargo, el problema podría reducirse, al menor en parte, si aún a los pacientes que necesitan tratamiento inmediato se les tomase las muestras clínicas para su estudio bacteriológico y de sensibilidad a los antimicrobianos. Esto no excluye que se inicie el tratamiento inmediatamente ( 22 ).

En este estudio, predominaron en los pacientes ambulatorios las muestras del aparato respiratorio ( Tabla III ) para lo cual no encontramos una explicación satisfactoria. En los pacientes hospitalizados predominaron las lesiones de piel, muchas de ellas infecciones de heridas operatorias adquiridas en el hospital. A propósito de esto, es bien conocido que el estafilococo es el agente que se aísla con más frecuencia - de infecciones de heridas postoperatorias ( 6 ). No observamos diferencia del porcentaje de cepas productoras de beta lactamasa aisladas de los diferentes tipos de muestra, excepto en los líquidos de derrame. Esto se debió posiblemente a la diseminación amplia que poseen los plasmidios en la población de estafilococos. No encontramos una explicación del relativamente bajo porcentaje de positividad observada en las muestras genitourinarias de los pacientes hospitalizados al compararlas con los ambulatorios. En todo caso posiblemente esta diferencia no sea significativa.

Obtuvimos más cepas de St. aureus de pacientes femeninos que masculinos (Tabla IV) consideramos este hallazgo una casualidad, no encontrando una explicación satisfactoria para este resultado. Ambos sexos presentaron igual porcentaje de positividad en la producción de penicilinas (94%-95% respectivamente). Todas las cepas aisladas de recién nacidos fueron productoras de beta lactamasa. Estas cepas presumiblemente fueron todas adquiridas en el hospital. Ya en 1964 Allwood y colaboradores (1) observaron una alta prevalencia de infecciones estafilocócicas, no necesariamente resistentes, en recién nacidos del Hospital de Maternidad. Estudios realizados en sala cunas han demostrado que la --

transmisión de ese microorganismo a los recién nacidos ocurre sobre todo por vía de las manos de miembros del personal encargados del cuidado de estos niños, que son portadores o se han infectado por manipulación de recién nacidos infectados o colonizados (1).

La correlación entre la resistencia a la penicilina y la ampicilina y la producción de beta lactamasa por Staphylococcus aureus permitió -- apreciar cuatro situaciones diferentes:

1. La mayoría de cepas de St. aureus 97% fueron resistentes a penicilina y ampicilina y productoras de penicilinasas, lo cual nos hace -- presumir que la resistencia era debida a la acción de la enzima sobre -- dichos antibióticos.

2. Un pequeño porcentaje de cepas resistentes a la penicilina y ampicilina (8%), no produjo beta lactamasa. Esa resistencia fué posiblemente mediada por otros mecanismos de resistencia tales como la tolerancia o mecanismos intrínsecos (30,31).

3. La gran mayoría de St. aureus beta lactamasa negativos fueron sensibles a la penicilina y ampicilina (92%), lo cual apoya la hipótesis -- mencionada en 1 de que la resistencia a esos antibióticos de los Staphylococcus es debida en la mayoría de casos a la producción de beta lactamasa y que las bacterias que no producen la enzima se puede pronosticar que serán sensibles a la penicilina y ampicilina.

4. Un porcentaje muy pequeño (3%) de Staphylococcus aureus fueron sensibles a penicilina y ampicilina y a la vez productores de beta lactamasa. Esta situación aparentemente paradójica puede explicarse por el hecho de que la beta lactamasa es una enzima inducible (21,24). Es posi-

ble que esas cepas de Staphylococcus aureus recién aisladas de pacientes no expuestas a penicilina, fueran sensibles a ese antibiótico; pero al ponerlas en contacto con ellos en el medio de cultivo, durante la realización de la prueba de sensibilidad, la pequeña cantidad de antibiótico contenida en el disco fue capaz de inducir la síntesis de la enzima, la cual fue detectada por ambos métodos acidométrico y yodométrico. Podría anticiparse que si esos pacientes, se someten a terapia con penicilina o ampicilina, no van a responder adecuadamente al tratamiento, ya que la inducción de la síntesis enzimática se realizaría en el paciente. En todo caso, esos resultados indican que la prueba de detección de beta lactamasa es más sensible que el antibiograma para determinar la sensibilidad del Staphylococcus aureus a la penicilina y más confiable para predecir la eficacia de la terapia con penicilina en el paciente con infecciones estafilocócicas ( 16,24 ).

Como era de esperarse, la situación fue muy diferente con la cefalosporina. No hubo correlación entre la resistencia al antibiótico y la producción de beta lactamasa; 93% de las cepas fueron sensibles a cefalosporina y productoras de beta lactamasa. Esto se debe a que utilizamos una cefalosporina de segunda generación (cefaloridina). Las cefalosporinas desarrolladas recientemente se han introducido precisamente por ser resistentes a la beta lactamasa (9,13,15). Las cefalosporinas llamadas de segunda y tercera generación tienen la ventaja de ser resistentes a la actividad de esa enzima lo cual les permite ser utilizadas eficazmente contra Staphylococcus y Haemophilus influenzae, que frecuentemente son productoras de beta lactamasa y resistentes a penicilina --

las pruebas, siendo los métodos cromogénico con cefalosporina y yodométrico más sensibles que el acidométrico. Estas diferencias suceden porque el comportamiento de las cepas bacterianas varían de un lugar a otro (18). Al igual que otros investigadores nosotros encontramos que el método yodométrico fue más rápido en detectar la penicilinasa que el método acidométrico. Así, Hejna (8) reportó resultados más rápidos del Staphylococcus con el método yodométrico y el de cefalosporina cromogénica (nitrocefín) que con el método acidométrico. En el estudio realizado obtuvimos resultados positivos a los 10 segundos con el método yodométrico, la mayoría de las cepas dieron resultados positivos antes de 2 minutos y el tiempo máximo fue de 4 minutos. Con el método acidométrico en cambio el tiempo mínimo fue de 2 minutos, la mayoría de cepas dieron resultados positivos antes de 30 minutos y el tiempo máximo fue de 4 horas. Esto se explica por las diferentes concentraciones de bacterias y por consiguiente de enzimas usadas en cada técnica. En el método yodométrico se usó una asada de 4 ó 5 colonias de bacterias la cual directamente se depositó sobre la tira de la prueba. Se usaron diluciones de este inóculo cuando las cepas presentaban demasiado pigmento dorado; ésto interfirió con la velocidad de reacción de la prueba; en esos casos se notó que la reacción era más lenta, pero no excedió de 4 minutos. Para el método acidométrico se usó una dilución equivalente a 60 millones de bacterias, número inferior al de bacterias presentes en 4 ó 5 colonias, y que contiene proporcionalmente menor cantidad de enzimas y por consiguiente tomará más tiempo para dar una reacción positiva. Además, se sabe que las diferentes clases de beta lactamasa A, B y C, tienen diferente eficiencia pa

ra hidrolizar el sustrato, lo cual hace variar el tiempo en el cual se puede apreciar la reacción como positiva ( 29 ).

En relación a la diferente eficiencia de las beta-lactamasas A, B y C para hidrolizar el sustrato, Barker en 1957, decía que uno de los factores que influyen la habilidad del Staphylococcus de sobrevivir en el ambiente hospitalario es la eficiencia de su penicilinasas para destruir la penicilina. Esta eficiencia depende no solo de la velocidad máxima de hidrólisis del sustrato sino también de la constante de Michaelis -- (Km) de la enzima, y se ha sugerido el término "eficiencia fisiológica" definida como :  $K_m / \text{Vel. máxima}$ , para describir la eficiencia de la penicilinasas para destruir la penicilina bajo condiciones fisiológicas -- ( 29 ). Se ha observado que los estafilococos de los grupos bacteriofágicos I y III predominan en el ambiente hospitalario, y esa alta prevalencia parece deberse a que sintetizan penicilinasas A y C que tienen alta eficiencia fisiológica. Los estafilococos del grupo II que producen penicilinasas tipo B, que es 10 veces menos eficiente que las anteriores, son menos frecuentes como causa de infección nosocomial ( 29 ). En el presente trabajo no se identificó a que grupo bacteriofágico pertenecían las cepas de Staphylococcus aureus estudiadas, por carecer de los reactivos necesarios.

En nuestro medio, por la escasez de recursos, el método yodométrico, que utiliza reactivos fácilmente obtenibles, de bajo precio y que se pueden preparar con el equipo mínimo usualmente disponible en el laboratorio, es el procedimiento que podría recomendarse para la detección de la beta lactamasa. Además, la interpretación de los resultados no requie

re personal especializado, asimismo, el corto tiempo necesario para detectar la presencia de la enzima lo hace especialmente útil en el ambiente hospitalario con enfermos graves que necesitan una rápida implementación de una terapia efectiva. La estabilidad prolongada de los reactivos en las tiras mantenidas en el congelador ( 0°C a -6°C ) del refrigerador es una ventaja más del método yodométrico. La aplicación de la técnica yodométrica directamente con muestras clínicas ( 14 ) aumentará la utilidad de la prueba sobre todo en el paciente severamente enfermo; sin embargo esta modalidad de la técnica todavía no se ha perfeccionado como para poderla aplicar confiablemente al paciente y su sensibilidad es baja ( 56% ). Bae (2) describe otra variante del método yodométrico aplicado a cultivos puros de bacterias, su ventaja es que detecta la penicilinasa y el número de bacterias por mililitros.

El método acidométrico aunque de idéntica sensibilidad que el yodométrico es más complicado y los reactivos son menos estables por lo que no lo recomendamos como procedimiento de rutina para los laboratorios de nuestro país. Existen variantes simplificadas de la técnica acidométrica disponibles comercialmente, pero su costo es un factor importante que limita su uso en el país ( 8 ).

En base a los resultados del presente trabajo y tomando en cuenta la alta prevalencia de Staphylococcus aureus resistentes y productores de beta lactamasa en el medio hospitalario y en la comunidad, consideramos necesario que la prueba yodométrica rápida en tira de papel se aplique a todos los cultivos de Staphylococcus aureus aislados de pacientes para proporcionar información sobre la producción de beta lactamasa que --



permita la aplicación de una terapia más apropiada.

## V. CONCLUSIONES

1. El Staphylococcus aureus productor de beta lactamasa constituye un problema serio como causa de infección en los pacientes atendidos en el Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, ya que de 500 cepas de Staphylococcus aureus estudiadas, 475 (95%) resultaron ser productoras de beta lactamasa. Esos Staphylococcus son también resistentes a penicilina y ampicilina. La mayoría de cepas son sensibles a cefalosporina a pesar de ser productoras de beta lactamasa.

2. Se determinó que la frecuencia de Staphylococcus aureus productor de beta lactamasa fue similar en pacientes hospitalizados y ambulatorios (96% - 94%, respectivamente).

3. Los resultados de este estudio demostraron que el método yodométrico rápido en tira de papel es confiable para la detección de beta lactamasa, cuya presencia se relaciona con la resistencia a penicilina. Los reactivos para esa técnica son fáciles de preparar y sumamente económicos y la técnica sencilla de realizar por lo que se recomienda sea utilizada de rutina en los Laboratorios Clínicos de los Hospitales de El Salvador, como parte del estudio de sensibilidad a las drogas de las cepas de Staphylococcus aureus.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Allwood Paredes, et al. Investigación y control de la infección hospitalaria en un hospital de maternidad. Archivos del Colegio Médico de El Salvador. Vol. 17. 190-200 p. 1964.
2. Bae H.C. Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* for 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 3a. Ed. Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A. 1973. 500 p.
4. Bonilla J. Consideraciones sobre el antibiograma. Tribuna Médica. -- Vol. XXXII (5) Sep. 47-48 p. 1982.
5. Boughton, W.H. Rapid detection in spinal fluid of beta lactamase produced by ampicillim resistant *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 15 (6): 1167-68. 1982.
6. Davis B.D. et al. Microbiology. 3a. Ed. Filadelfia. Harper and Row - Publishers, Inc. 1980. 624-33 p.
7. Goodman, L.S. and Gilman, A. The pharmacological basis of therapeutics 5a. Ed. London The Macmillan Company, Inc. New York. 1975. 1704 p.
8. Hejna J.M. et al. Detection of Beta-lactamase production in aerobic and anaerobic bacteria. B.B.L. Microbiology systems, Cockeysville, MD. 1983.

9. Herxhamer A. et al. Cefalosporinas hoy y mañana. Drug and Therapeutics Bulletin. 20: 19. 1983.
10. Istre, R. Gregory. et al. Chloramphenicol and penicillim resistance in Pneumococci isolated from blood and cerebrospinal fluid: a prevalence study in Metropolitan Denver. J. Clin. Microbiol. 17 (3): 472 - 475 1983.
11. Jawetz Ernest et al. Manual de Microbiología Médica. 9a. Ed. Editorial El Manual Moderno, S.A. 1981. 595 p.
12. Jephcott A.E. et al. Penicillinase-producing Gonococci in Britain. Lancet. 1981.
13. Jones R.N. and A.L. Barry. Cefoperazone: a review of its antimicrobial spectrum, B-lactamase stability, enzyme anhibition and other in vitro characteristics. Reviews Infectious Disease 5 (suppl.). 108-123 p. -- 1983.
14. Kilpatrick, E.J. and E.A. Edwads. Rapid diagnosis of Beta-lactamase - enzyme in penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. Naval Health Res. Ctr. San Diego Calif.
15. Laverdiere M. Wheeler N. Sabat LD. Cefuroxime resistance to Staphylococcal B-lactamases. Proc. R. Soc. Med. (lond) 70 (suppl 9): 72-3. -- 1977.
16. Lee, W.S. and L. Komarmy. Iodometric spot test for detection of beta-lactamase in Haemophilus influenzae. J. Clin. Microbiol. 13: 224-25. 1981.

17. Lennette. E.H. et al. Manual of Clinical Microbiology. 3a. Ed. --- Washington, D.C. American Society for Microbiology 1980. 478-84 p.
18. Levy S.B. Microbiol resistance to antibiotics. Lancet. 1982.
19. Marinero Cáceres J.A. El comité de infecciones nosocomiales del Hospital Rosales. Archivos del Colegio Médico de El Salvador. 37 (1): 43-51. 1982.
20. Marinero Cáceres J.A. et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en el Departamento de Cirugía del Hospital Rosales. Archivos del Colegio Médico de El Salvador. 37 (1): 52-65. 1982.
21. Martin D.W. et al. Harper's Review of Biochemistry 18a. Ed. Lange Medical Publications California. U.S.A. 1981. 87 p.
22. Modai J. Antibiotics. Tribuna Médica. Vol. XXXII (5) Sep. 1982. 33-46 p.
23. Murray, B.E. y Moellering, Jr. R.C. Tipos de resistencia antibiótica y mecanismos correspondientes. Clínicas Médicas N.A. 5: 909-932. 1978.
24. Oberhofer, T.R. and Towle, D.W. Evaluation of the rapid penicillinase paper strip test for detection of beta lactamase. J. Clin. Microbiol. 15 (2): 196-99. 1982.
25. O'Brien T.F. and others: International comparison of prevalence of resistance to antibiotics. JAMA. 239: 1518. 1978.
26. O'Grady F.W. Twenty one years of beating beta-lactamases. British Medical Journal. 284: 369-70. 1982.

27. Ramírez, Boettner C.M. et al. Contagio intrahospitalarios. Boletín de la oficina Sanitaria Panamericana. 62 (6): 538-45. 1967.
28. Rhoads, J.E. Impacto de la nutrición sobre la infección. Clin. Quir. N.A. 1: 39-45. 1980.
29. Richmond MH, Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. Biochem J. 94: 584-93. 1965.
30. Sabath, L.D. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. Annals of Internal Medicine. 97 - (3): 339-44. 1982.
31. Sabath, L.D. et al. A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. Lancet. 1: 443-47. 1977.
32. Tomasz A. Albino. A. Zanti E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature. 227: 138-40. 1970
33. Yolken, R.H. and Hughes, W.T. Rapid diagnosis of infections caused by B-lactamase-producing bacteria by means of an enzyme radioisotopic - assay. J. Pediatrics. 97 (5): 715-20. 1980.
34. Yolken, et al. Ampicillin treatment failure of apparently B-lactamase negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel B-lactamase. Lancet 1981.

## VII. APENDICE

### 1. Medio de Mueller Hinton

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Infusión de carne de res | 2.0 gms.  |
| Peptone Acidicase        | 17.5 gms. |
| Almidón                  | 1.5 gms.  |
| Agar                     | 17.0 gms. |
| pH final 7.4             |           |

1. Suspenda 38 gms. del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y deje que hierva durante un minuto.
2. Esterilice a 121°C a 15 lbs. de presión por 15 minutos.
3. Enfríe a 45 a 50°C y distribúyalo en placas de Petri.

### 2. Medio para prueba de fermentación del Manitol

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Tryptacase peptone     | 10.0 gms.  |
| Cloruro de sodio       | 5.0 gms.   |
| D-Manitol              | 5.0 gms.   |
| Rojo de fenol          | 0.018 gms. |
| pH final 7.2 $\pm$ 0.2 |            |

1. Disuelva 20 gms. del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezcle bien. Caliente hasta que se disuelva sin dejar que hierva.
2. Dispense 1 ml. de medio en cada tubo y esterilice a 121°C a 15 lbs. de presión por 15 minutos.
3. Almacene a temperatura de refrigeración.

### 3. Escala de Mc Farland

Los patrones de referencia se preparan en 10 tubos de diámetro uniforme.

1º Agregar 0.1 ml de una solución químicamente pura de cloruro de Bario al 1%; agregando consecutivamente a cada uno de los tubos 0.1 ml. - de cloruro de Bario.

|    |   |              |                           |
|----|---|--------------|---------------------------|
| 1  | - | tubo 0.1 ml. | de cloruro de Bario al 1% |
| 2  | - | tubo 0.2 ml. | " " "                     |
| 3  | - | tubo 0.3 ml. | " " "                     |
| 4  | - | tubo 0.4 ml. | " " "                     |
| 5  | - | tubo 0.5 ml. | " " "                     |
| 6  | - | tubo 0.6 ml. | " " "                     |
| 7  | - | tubo 0.7 ml. | " " "                     |
| 8  | - | tubo 0.8 ml. | " " "                     |
| 9  | - | tubo 0.9 ml. | " " "                     |
| 10 | - | tubo 1.0 ml. | " " "                     |

2º Luego agregar a cada uno de los tubos cantidad suficiente de una solución químicamente pura de  $H_2SO_4$  (ácido sulfúrico) al 1%. Hasta 1 - ml. de 10 cc.

|   |   |              |                               |              |
|---|---|--------------|-------------------------------|--------------|
| 1 | - | tubo 0.1 cc. | de cloruro de Bario + 9.9 ml. | de $H_2SO_4$ |
| 2 | - | tubo 0.2 cc. | " " 9.8 ml.                   | "            |
| 3 | - | tubo 0.3 cc. | " " 9.7 ml.                   | "            |
| 4 | - | tubo 0.4 cc. | " " 9.6 ml.                   | "            |
| 5 | - | tubo 0.5 cc. | " " 9.5 ml.                   | "            |



|    |   |      |         |                       |         |                                   |
|----|---|------|---------|-----------------------|---------|-----------------------------------|
| 6  | - | tubo | 0.6 cc. | de cloruro de Bario + | 9.4 ml. | de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| 7  | - | tubo | 0.7 cc. | "                     | "       | 9.3 ml.                           |
| 8  | - | tubo | 0.8 cc. | "                     | "       | 9.2 ml.                           |
| 9  | - | tubo | 0.9 cc. | "                     | "       | 9.1 ml.                           |
| 10 | - | tubo | 1.0 cc. | "                     | "       | 9.0 ml.                           |

3º Sellar los tubos, en solución químicamente estable por meses

| tubos | Bacterias por cc. |
|-------|-------------------|
| 1     | 300.000.000       |
| 2     | 600.000.000       |
| 3     | 900.000.000       |
| 4     | 1.200.000.000     |
| 5     | 1.500.000.000     |
| 6     | 1.800.000.000     |
| 7     | 2.100.000.000     |
| 8     | 2.400.000.000     |
| 9     | 2.700.000.000     |
| 10    | 3.000.000.000     |