

Prevalencia de la *Neisseria gonorrhoeae* productora de beta lactamasa.

César Arango, M.D.¹, Gustavo Bergonzoli P., M.D.², Gonzalo Zafra, M.D.⁺³ y María Nelly de Sarria, Bact.⁴.

RESUMEN

Se tomaron 291 muestras genitourinarias a 29 hombres y 266 mujeres, para determinar la prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* productora de beta lactamasa (NGBL), identificarla por la técnica de fermentación rápida de azúcares en medios líquidos y establecer la prevalencia de cepas de crecimiento lento (NGCL) con más de 48 horas de incubación. Casi 75% de los hombres y 21% de las mujeres fueron positivos para NG y 4% y 6%, respectivamente, tuvieron NGBL. Al tratarlos con penicilina G procaínica o prevecilina, recayeron. También recayeron 17% de las mujeres y 6% de los hombres negativos para NGBL. Asimismo 20% o más de las cepas fueron NGCL. El 95% o más de las cepas se identificaron en 3 horas o menos. La presencia de cepas resistentes *in vitro* o *in vivo* a penicilina, implica el uso de pruebas de susceptibilidad a otros antibióticos y un seguimiento estricto.

En 1976 apareció en EE.UU. y procedente de Filipinas y en Gran Bretaña, el primer informe sobre cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) productoras de B-lactamasa (PPNG) y en consecuencia resistentes a la penicilina^{1,3}. Otros 16 países han comunicado el mismo hallazgo^{4,5}. Aunque casi todas las cepas resistentes a penicilina son productoras de B-lactamasa (BL), una proporción menor es resistente por otros mecanismos¹. En estas circunstancias se deben usar otros medicamentos más costosos como la cefuroxima, espectinomicina, cefoxitina, cefotaxima o ceftriaxona².

El estudio de la susceptibilidad de la NG a la penicilina se ha hecho por el método del disco o por el de dilución en agar¹ que requieren un mínimo de 18 horas después de haber cultivado al microorganismo, o por la técnica de demostración de BL, con el método de la tira de papel que sólo requiere algunos minutos para su interpretación¹.

Para identificar las diferentes especies de *Neisseria*, tradicionalmente se ha usado la técnica de fermentación de carbohidratos en medios semisólidos (CTA)¹.

Este método exige subcultivos puros de *Neisseria*, pues la presencia de bacterias inhibidas pero viables en el cultivo primario hecho en medio de Thayer-Martin, puede dar resultados falsos. Esto implica un retardo de 1 a 4 días para la identificación de la NG una vez hecho el cultivo primario, pues se requieren 18 o más horas para el subcultivo y 1 hora a 3 días para la fermentación de azúcares¹. Recientemente se ha introducido la técnica de fermentación rápida en medios líquidos, que no necesita subcultivos puros, ni crecimiento posterior de la bacteria en el medio y por tanto, se puede leer en menos de 4 horas. El uso simultáneo de esta técnica y la demostración de BL puede acortar la identificación y susceptibilidad de una cepa de NG, de 4 días a unas pocas horas¹. En relación con el aislamiento primario de la bacteria, se recomienda la incubación de las muestras hasta por 48 horas. Sin embargo, desde 1975 se han descubierto cepas de crecimiento lento (cepas AHL) y algunas de ellas no se descubrirían si la incubación se suspendiera a las 48 horas¹.

La blenorragia continúa siendo un problema importante de salud pública en todo el mundo. En los Estados Unidos se calcula una incidencia anual de 3'000 000 de casos¹. El tratamiento tradicionalmente recomendado para la blenorragia aguda no complicada, ha sido la penicilina procaínica en dosis de 4'800.000 UI por vía IM, con 1 g de probenecid (Benemid®) por vía oral².

1. Profesor Asociado, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesor Asistente, Departamento de Medicina Social, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. (Fallecido). Médico del Programa de Control de Enfermedades de Transmisión Sexual, Unidad Regional de Salud, Cali, Valle.
4. Bacterióloga, Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia.

En Colombia no se conoce la prevalencia de NG productora de BL, aunque hay una publicación que se refiere a la no resistencia a la penicilina⁶.

Este trabajo clínico se propuso estudiar:

1. Determinar la prevalencia de NG productora de BL.
2. Utilizar la técnica de fermentación rápida de azúcares y verificar su viabilidad en Cali.
3. Determinar el tiempo requerido para el crecimiento bacteriano e identificar la presencia de cepas de crecimiento lento.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en dos organismos de salud de la Unidad Regional de Salud de Cali y en los dos centros de rehabilitación (cárceles) de la ciudad, entre los meses de noviembre de 1982 a octubre de 1983.

Tamaño de la muestra

Con técnicas estadísticas conocidas⁷ y con base en la información sobre la prevalencia institucional⁸⁻¹⁰, se obtuvo un tamaño de 69 pacientes en cada grupo ($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.05$ y 3.5 riesgos relativos).

Caso de estudio

Se tomó como tal la persona con historia de relaciones sexuales recientes (menos de 15 días), con un cuadro clínico compatible con blenorragia, esto es, secreción genital purulenta, sin complicaciones descubribles (orquitis, anexitis,

etc.) y que no hubiese recibido ninguno de los antimicrobianos usados en el estudio.

Procedimiento de laboratorio

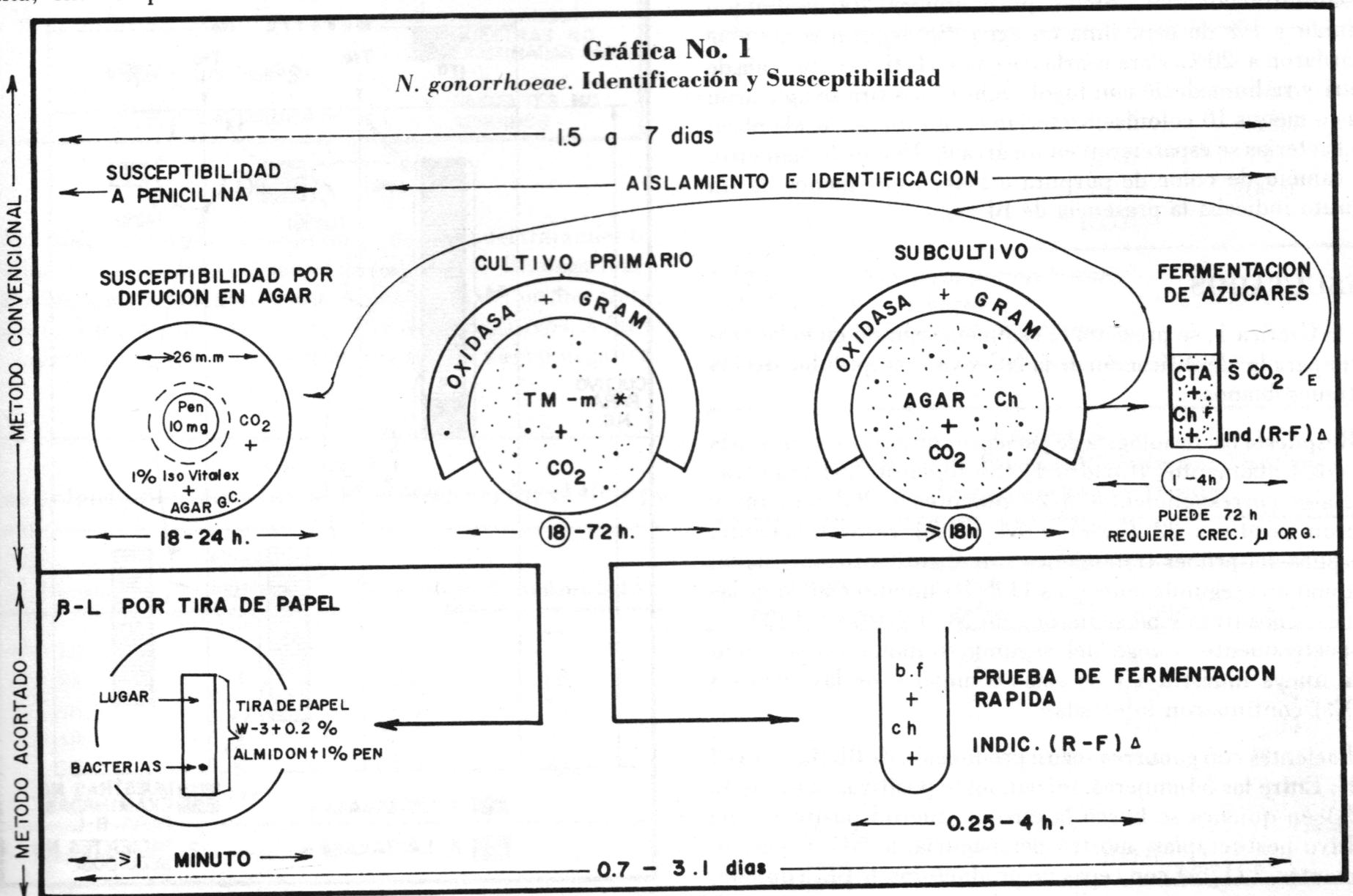
A cada paciente que cumplió con la definición de caso, se le tomaban dos muestras de la secreción genital, previo lavado de los genitales externos con solución salina. Las muestras se tomaron del endocérvix o de la uretra con un hisopo de alginato de calcio que se introducía luego en tubos individuales con medio de transporte y se llevaban inmediatamente al laboratorio de enfermedades infecciosas del Hospital Universitario, donde se procesaban el mismo día. A cada muestra se le hizo coloración de Gram, cultivo e identificación y se buscó la producción de BL.

Métodos

La coloración de Gram se hizo mediante la técnica establecida¹. El resultado se cuantificó de acuerdo con el número de microorganismos por campo de inmersión¹, así:

Número de cruces	Microorganismo por campo
4	Más de 30
3	5 - 29
2	2 - 4
1	1 ó menos.

Las muestras se sembraron en medio de Thayer-Martin modificado y se incubaron en recipientes cerrados por el método de la vela¹. Se mantuvieron a 35-37°C durante 72 horas, y se buscó la presencia de crecimiento a las 12, 24, 48 y 72 horas.



Cuadro 1
Persistencia de NG Después de Dos Tratamientos

Sexo	Primera		Segunda		Tercera	
	No. tomados	No. % positivas	No. tomados	No. % positivas	No. tomados	No. % positivas
Hombres	29	22 (75)*	11	1 (10)	0	
Mujeres	262	54 (21)+	41	8 (20)	7	4 (60)
Total	291	76 (26)	52	9 (17)	7	4 (60)

* A 4 cepas no se les hizo fermentación de azúcares.

+ Además de estas cepas de NG se aislaron 4 *Neisseria* no *gonorrhoeae*

A las colonias compatibles con *Neisseria* se les practicó coloración de Gram, prueba de citocromo-oxidasa y fermentación de azúcares. Esta última con el siguiente procedimiento: Se preparó una solución concentrada con las bacterias, hasta llenar dos asas de alambre de 3 mm y se diluyeron en 0.3 ml de amortiguador. En un tubo de 12x100 mm con 0.1 ml se añadió una gota de la solución concentrada de bacterias más un indicador¹, se mezcló bien y se colocaron a 35°C (baño de María) durante 4 horas sin CO₂. Se leyó la acidificación manifestada por un color amarillo (positivo). Esto se hizo cada 15 minutos durante las cuatro horas.

La producción de B L se investigó por el método de la tira de papel así: se tomaron tiras de papel de filtro Whatman N° 3 y se saturaron con una solución que contenía 0.266 de almidón soluble y 1% de penicilina en agua. Se dejaron secar y se guardaron a -20°C. Para usarlas se colocó la tira en una caja de Petri y se humedeció con lugol. Sobre cada tira se aplicaron más o menos 10 colonias bacterianas con un asa de alambre; las bacterias se esparcieron en un área de 15 mm de diámetro. El cambio de color de púrpura a blanco en menos de un minuto indicaba la presencia de BL¹.

RESULTADOS

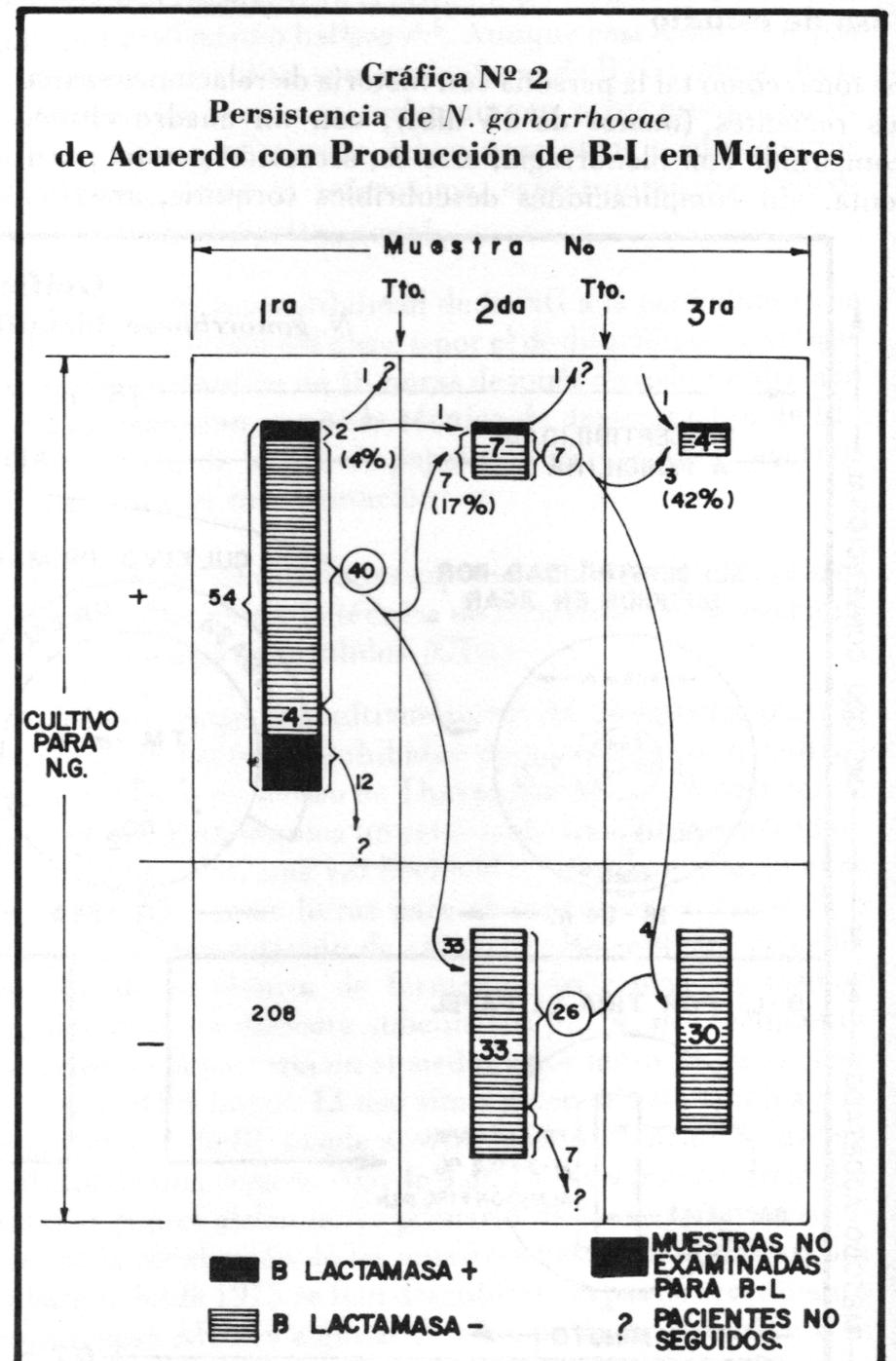
En la Gráfica 1, se presenta el esquema seguido en el laboratorio para la identificación de la NG y su susceptibilidad a los antimicrobianos.

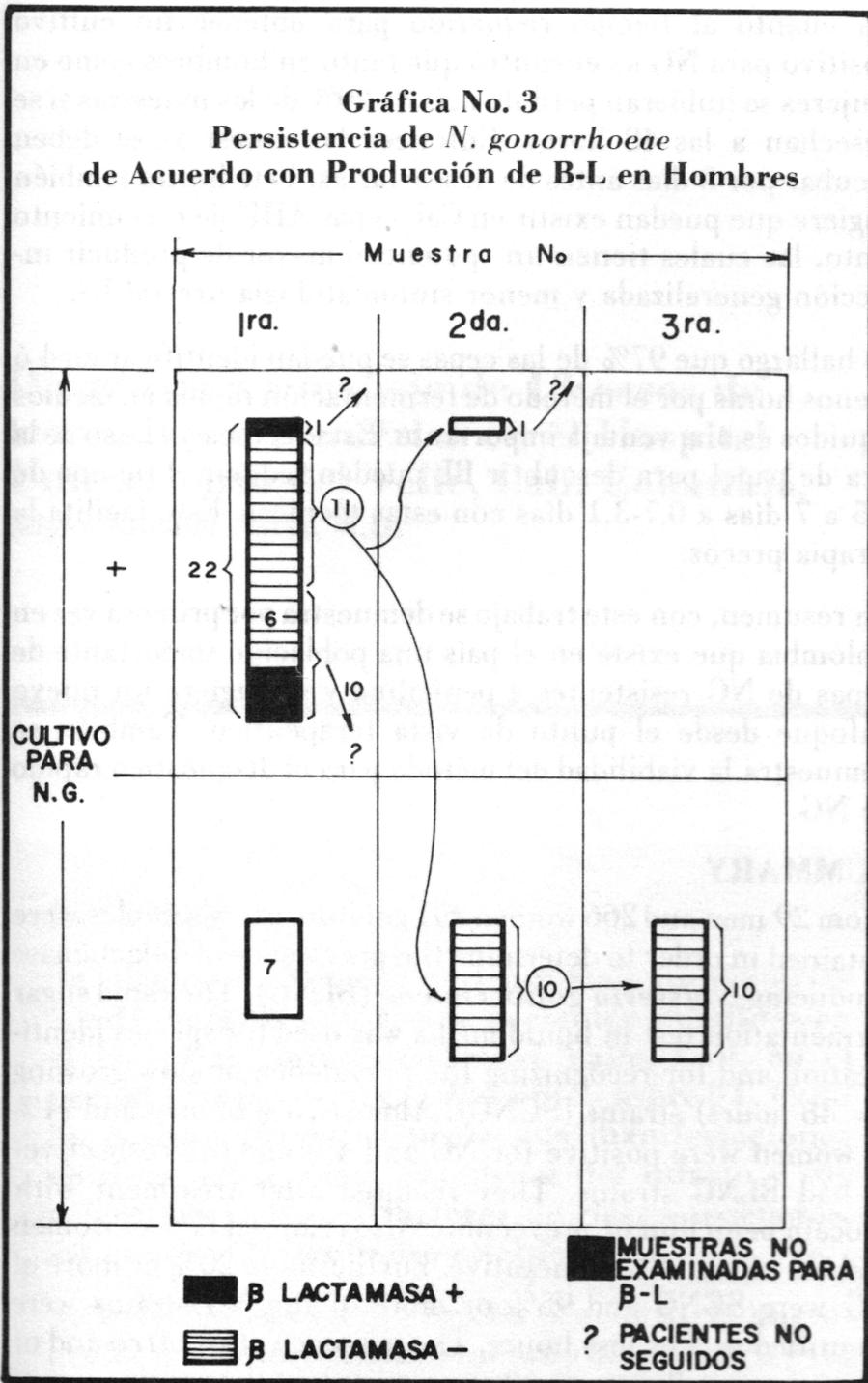
1. Respuesta bacteriológica de paciente con gonorrea, después de dos tratamientos (Cuadro 1). Se tomaron 291 muestras iniciales correspondientes a 29 hombres y 262 mujeres y fueron positivas 22 (75%) y 54 (21%) respectivamente. Después del primer tratamiento con el antibiótico asignado, se tomó una segunda muestra a 11 de los hombres y a 41 de las mujeres positivas y persistieron con NG 1 (10%) y 8 (20%), respectivamente. Luego del segundo tratamiento se tomó una nueva muestra a 7 de estas 8 mujeres de las cuales 4 (60%) continuaron infectadas.

2. Pacientes con gonorrea según producción de BL (Gráficas 2 y 3). Entre las 54 mujeres, inicialmente positivas, 2 de las 46 (4%) en quienes se buscó la enzima, fueron positivas y el cultivo post-terapias, mostró persistencia de NG. De las 40 pacientes, 7 (17%) con cepas no productoras de BL, a quienes

se les tomó un segundo cultivo, persistieron infectadas. De las 33 con el segundo cultivo negativo, a 26 se les repitió y se confirmó su curación.

Entre los hombres, a 18 de los 22 con cultivos positivos, se les buscó la presencia de BL en la cepa cultivada. De estos 18, 1





(6%) fue positivo pero no se lo siguió después del tratamiento. De los 17 con cultivo inicial positivo pero con BL negativa, a 11 se les tomó una segunda muestra después del primer tratamiento, 1 fue de nuevo positivo y 10 fueron negativos. A éstos se les tomó una tercera muestra, que fue de nuevo negativa.

Cuadro 2
Crecimiento de *Neisseria* en Hombres según el tiempo

Horas	Cepas positivas	Porcentaje	% acumulado
18	0		
24	4	17.4	17.4
36	2	8.7	26.1
48	12	52.2	78.3
72	5	21.7	100.0
Total	23*	100.0	

19 Cepas de *Neisseria gonorrhoeae*
4 Cepas de *Neisseria* sp.

No hubo diferencia en la respuesta terapéutica a los dos regímenes de penicilina.

3. Distribución de cultivos positivos según el tiempo (Cuadros 2 y 3).

a. **Hombres.** A 19 de las muestras positivas para NG y a 4 *Neisseria* sp., se les midió el tiempo requerido para la visualización de las colonias. Una quinta parte de las muestras requirió más de 48 horas.

b. **Mujeres.** A 58 de las 66 muestras positivas para NG y a otras muestras (8 *Neisseria* sp., y 4 *Neisseria* no **gonorrhoeae**) se les midió el tiempo necesario para obtener visualización de las colonias. Una cuarta parte necesitó más de 48 horas.

4. Distribución de pruebas bioquímicas positivas según el tiempo (Cuadros 4 y 5).

a. **Hombres.** A 19 de las muestras positivas para NG se les midió el tiempo requerido para ser positivas a una prueba bioquímica. Tres cuartos y el total de las muestras fueron positivas en la primera media y 3 horas, respectivamente.

b. **Mujeres.** Se estudiaron 58 cepas de NG y 4 de *Neisseria* no **gonorrhoeae** y fueron positivas 85% y 95% a la media y 3 horas, respectivamente.

Cuadro 3
Crecimiento de *Neisseria* en Mujeres según el Tiempo

Horas	Cepas positivas	Porcentaje	% acumulado
18			
24	13	18.6	18.6
36	25	35.7	54.3
48	14	20.0	74.3
72	18	25.7	100.0
Total	70*	100.0	

* 58 Cepas de *Neisseria gonorrhoeae*
8 Cepas de *Neisseria* sp.
4 Cepas de *Neisseria* no *gonorrhoeae*

Cuadro 4
Distribución de Pruebas Bioquímicas Positivas en Hombres según el Tiempo

Tiempo (horas)	Cepas positivas	Porcentaje	% acumulado
1/2	14	73.7	73.7
1	2	10.5	84.2
2	2	10.5	94.7
3	1	5.3	100.0
4	0	-	
20	0	-	
Total	19*	100.0	

Cuadro 5
Distribución de Pruebas Bioquímicas Positivas
en Mujeres según el Tiempo

Horas	Pruebas positivas	Porcentaje	% acumulado
1/2	53	85.5	85.5
1	3	4.9	90.4
2	2	3.2	93.6
3	1	1.6	95.2
4	1	1.6	96.8
20	2	3.2	100.0
Total	62*	100.0	

58 Cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

4 Cepas de *Neisseria no gonorrhoeae*

COMENTARIOS

La alta proporción de NG (75%) en hombres con sintomatología de uretritis, está de acuerdo con la distribución de esta enfermedad en ciudades grandes y en grupos jóvenes presumiblemente con alta promiscuidad sexual¹¹ como la población carcelaria. Aunque el número de mujeres sintomáticas con gonorrea fue mayor, la proporción con respecto a las examinadas fue inferior (21%).

Se espera una falta de respuesta bacteriológica a la penicilina en la mujer portadora de una cepa de NG que produce BL. Sin embargo, el fracaso terapéutico en 17% de ellos con cepas no productoras de BL es sorprendente. El hecho que casi la mitad (42%) de este subgrupo se hubiera curado con un segundo tratamiento y que la tasa de fracaso terapéutico en hombres fue menor (9%), sugiere que la resistencia no es absoluta. La razón de esta resistencia no se estableció en este trabajo. La NG también puede ser resistente a penicilina por mecanismos mediados a través de información genética contenida en los cromosomas^{1,2}. Ambos tipos de resistencia se pueden descubrir por el método de Kirby Bawer modificado o por el método de dilución en agar¹. El primero requiere un disco de 10 µg de penicilina G que se coloca en un agar GL, con 1% de Isovitalex® y que se incuba en CO₂ por 18-24 horas¹. Ambos son más costosos y prolongados que el descubrimiento de BL por tiras de papel.

Una vez documentada la resistencia a penicilina G por uno de estos métodos se debe pasar a hacer susceptibilidades a espectinomicina o cefalosporinas de segunda o tercera generación por el método de dilución en agar¹.

Sin embargo, el hallazgo de 4% a 6% de cepas de NG productoras de BL justifica el uso empírico inicial de estas alternativas si no se dispone de la técnica de laboratorio apropiada o de mecanismos bacteriológicos de seguimiento². Esta conducta estaría reforzada por la tasa de fracaso terapéutico en 9% a 17% de hombres y mujeres, respectivamente, aun en cepas de NG no productoras de BL. El uso de tetraciclina no estaría indicado, pues las cepas resistentes a penicilina frecuentemente lo son a tetraciclina. El uso de espectinomicina se debe acompañar de pruebas de susceptibilidad en pacientes con fracaso terapéutico porque su uso puede inducir la aparición de cepas resistentes^{1,2}.

En cuanto al tiempo requerido para obtener un cultivo positivo para NG se encontró que tanto en hombres como en mujeres se hubieran perdido más de 20% de las muestras si se desechan a las 48 horas. Entonces las muestras se deben incubar por 3 días antes de descartarlas. Este hecho también sugiere que puedan existir en Cali cepas AHU de crecimiento lento, las cuales tienen un potencial mayor de producir infección generalizada y menor sintomatología uretral^{1,2}.

El hallazgo que 97% de las cepas se puedan identificar en 4 ó menos horas por el método de fermentación rápida en medios líquidos es una ventaja importante. Esta técnica y el uso de la tira de papel para descubrir BL pueden reducir el tiempo de 1.5 a 7 días a 0.7-3.1 días con estas técnicas. Esto facilita la terapia precoz.

En resumen, con este trabajo se demuestra por primera vez en Colombia que existe en el país una población importante de cepas de NG resistentes a penicilina y se sugiere un nuevo enfoque desde el punto de vista terapéutico. También se demuestra la viabilidad del método para el diagnóstico rápido de NG.

SUMMARY

From 29 men and 266 women 291 genitourinary samples were obtained in order to determine the prevalence of B-lactamase producing *Neisseria gonorrhoeae* (BLNG). The rapid sugar fermentation test in liquid media was used for species identification and for recognizing the prevalence of slow growing (> 48 hours) strains (SGNG). Almost 75% of men and 21% of women were positive for NG and 4% and 6% respectively had BLNG strains. They relapsed after treatment with procain penicillin or prevecillin. Also relapsed 17% of women and 6% of men BLNG negative. Furthermore 20% or more of NG were SGNG and 95% or more of the NG strains were identified in 3 or less hours. The presence of *in vitro* and or *in vivo* penicillin resistant strains implies the routine use of susceptibility tests and a close follow-up.

REFERENCIAS

- Morello, J.A., Janda, W.M. y Bohnhof, M.: *Neisseria and Branhamella*. Pp 176-192. En Lennette, E. H., Balow A., Hansler, W. J., Truaret, J.P. (eds.). **Manual of clinical microbiology**, 1149 pp., 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, 1985.
- Black, J. R. y Sparling, P. F.: *Neisseria gonorrhoeae*. Pp. 1195-1205, in Mandell, G., Douglas, G., Bennet, J. (eds.). **Principles and practice of infectious diseases**. 1760 pp., 2nd ed. John Wiley & Sons. New York, 1981.
- Ashford, W. A., Golash, R. G. y Hemming, V. G.: Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Lancet**, 1976, **2**: 657.
- Penicillinase (B-lactamase) producing *Neisseria gonorrhoeae* world wide. **MMWR**; 1978, **27**: 10-15.
- Spectinomycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* world wide. **MMWR**, 1982, **31**: 632-637.
- Díaz, F.: Enfermedades sexualmente transmisibles. P. 626. En **Fundamentos de medicina**, 3. ed. Vélez, H., Borrero, J., Restrepo, J., Rojas, W. (eds.). Corporación de Investigaciones Biológicas, Medellín, 1984.
- Colton, T.: **Statistics in medicine**. Pp. 97-252, Little Brown & Co., Boston, 372 pp., 1974.
- Bergonzoli, G.: Blenorragia aguda, no complicada. Tratamiento con dosis única de minociclina. **Tribuna Med**, 1977, **55**: 31-32.
- Bergonzoli, G. y Arango, C.: Dosis única de penicilina en blenorragia: Comparación de dos esquemas terapéuticos. **Tribuna Med**, 1984, **70**: 46-48.
- Bergonzoli, G.: Vibramicina en el tratamiento de la blenorragia aguda. *Revista Pfizer*, 1979.
- Fiumara, N. J. gonorrea and herpes genitalis. **Infect Dis Practice**, 1982, **6**: 1-8.