

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* por difusión con discos

Dr. Rafael Llanes Caballero,<sup>1</sup> Lic. Juan C. Acosta Giraldo,<sup>2</sup> Dr. Jorge Sosa Puente,<sup>3</sup> Lic. Daymi Guzmán Hernández,<sup>4</sup> Téc. Oderay Gutiérrez González<sup>5</sup> y Dra. Alina Llop Hernández<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se realizó en el laboratorio de Gonococo del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" un estudio de la susceptibilidad *in vitro* de *Neisseria gonorrhoeae* a la penicilina, tetraciclina, cefuroxima, ceftriaxona, cefotaxina y ciprofloxacina, por el método de difusión con discos, utilizando el medio de agar base GC más suplemento. En una primera etapa se estandarizó el método y se utilizó la cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. En la segunda etapa se estudiaron 50 cepas de gonococo aisladas de 8 provincias de Cuba durante 1995 y 1996. Los resultados de la estandarización demostraron que los valores de susceptibilidad antimicrobiana estaban dentro de los límites aceptados. El 52 y el 34 % de las cepas fueron resistentes a la penicilina y la tetraciclina respectivamente y todas resultaron susceptibles al resto de los antimicrobianos evaluados. Recomendamos el uso del método de difusión con discos para la vigilancia de la sensibilidad del gonococo a estas drogas en nuestro país.

**Descriptores DeCS:** NEISSERIA GONORRHOEAE; BACTERIAS; RESISTENCIA A LAS DROGAS; RESISTENCIA A LA TETRACICLINA; RESISTENCIA A PENICILINA.

La habilidad de *Neisseria gonorrhoeae* para desarrollar resistencia a las drogas antimicrobianas se ha convertido en un importante problema para el tratamiento y control de la enfermedad gonocócica en el mundo.<sup>1</sup> La vigilancia continua de la sensibilidad del gonococo a los antimicrobianos constituye una de las principales tareas de los laboratorios de *Neisseria*; esta vigilancia permite conocer la situación de la resistencia en cada zona geográfica, región o país y la fecha de aparición de cepas resistentes a determinadas drogas, lo que determina la selección de la terapéutica adecuada.<sup>2</sup>

Entre los métodos de estudio de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *N. gonorrhoeae* están la dilución en agar, la difusión con tiras (*E-test*) y la difusión con discos. Los 2 primeros ofrecen resultados cuantitativos, es decir permiten conocer la concentración inhibitoria mínima necesaria para impedir el crecimiento del microorganismo, sin embargo, resultan costosos, requieren de un personal entrenado para su ejecución y no están al alcance de todos los laboratorios; en tanto el método de difusión con discos es sencillo, de costo permisible, no requiere de un personal calificado para su uso y

<sup>1</sup> Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>2</sup> Máster en Bacteriología-Micología. Licenciado en Microbiología. Centro de Investigaciones Biológicas.

<sup>3</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Agregado. IPK.

<sup>4</sup> Licenciada en Microbiología. IPK.

<sup>5</sup> Técnica en Procesos Biológicos. IPK.

<sup>6</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Titular. Subdirectora de Microbiología del IPK.

aunque cualitativo, brinda resultados confiables, lo que hace a este método útil, no sólo para los laboratorios de microbiología de instituciones altamente especializadas, sino también para laboratorios menos especializados.<sup>3</sup>

En la presente investigación los objetivos son, estandarizar el método de difusión con discos en el Laboratorio de Gonococo del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) y estudiar la sensibilidad antimicrobiana de 50 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en diferentes provincias de Cuba durante los años 1995 y 1996.

## MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Gonococo del IPK en el período comprendido entre abril y septiembre de 1996.

**Cepas.** Se evaluaron 50 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas durante 1995 y 1996 en 8 provincias del país. Las cepas fueron identificadas como gonococo si eran diplococos gramnegativos, oxidasa superoxol positivos y utilizaban solamente la glucosa en medio de agar cistina tripticasa.<sup>1</sup>

**Discos antimicrobianos.** Penicilina (10 U), tetraciclina (30 mg), (Industria Médico Farmacéutica, Cuba); ceftriaxona (30mg), cefotaxima (30 mg), cefuroxima (30 mg) y ciprofloxacina (5 mg) (Laboratorios Britania S.A, Argentina).

**Susceptibilidad antimicrobiana.** Se empleó el método de difusión con discos según las recomendaciones del Comité Nacional de Formas de Laboratorio Clínico (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS).<sup>4</sup> En una primera etapa se realizó la estandarización del método por 3 laboratoristas diferentes y se utilizó la cepa de referencia para evaluar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de gonococo (*N. gonorrhoeae* ATCC 49226) (tabla 1). En la segunda etapa se estudiaron 50 cepas de gonococo aisladas de enfermos con gonorrea en Cuba. El procedimiento empleado en ambos casos fue el siguiente: a partir de un subcultivo del microorganismo de 16 a 18 h de incubación en agar chocolate, se tomó una asada y se inoculó en caldo Mueller Hinton (OXOID), se ajustó la concentración del inóculo a una turbidez equivalente al patrón 0,5

de la escala de McFraland ( $10^8$  unidades formadoras de colonias/mL); con hisopo de algodón estéril se realizó luego la inoculación en medio agar base GC (OXOID) más suplemento enriquecedor al 1 %: L-cistina 1,1 g; L-cisteína 1,2 g; adenina 1 g; L-glutamina 10 g; hidrocloreto de guanina 0,03 g; hidrocloreto de tiamina 0,003 g; ácido paraaminobenzoico 0,013 g; vitamina B-12 0,01 g; cocarboxilasa 0,1 g; nicotinamida-adeninodinucleótido 0,25 g; nitrato férrico 0,02 g; glucosa 100 g y agua destilada 1 L (se esterilizó por filtración).

Se colocaron posteriormente los discos de antimicrobianos (3 por cada placa) y éstas se incubaron de 10-24 h a 35-36 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para la lectura se midieron los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo y se compararon con los patrones establecidos por el NCCLS (tablas 1 y 2).

**TABLA 1.** Rango de tamaño de zona de inhibición (MM) aceptable para la cepa de referencia de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226 (método de difusión con discos)

Antimicrobianos	Contenido del disco	Rango
Penicilina	10 U	26 - 34
Tetraciclina	30 mg	30 - 42
Ceftriaxona	30 mg	39 - 51
Cefotaxima	30 mg	38 - 48
Cefuroxima	30 mg	33 - 41
Ciprofloxacina	5 mg	48 - 58

Fuente: NCCLS 1993.<sup>4</sup>

**TABLA 2.** Criterios para la interpretación de la susceptibilidad *in vitro* de *Neisseria gonorrhoeae* a los antimicrobianos (método de difusión con discos)

Antimicrobianos	Resistente	Susceptibilidad	
		disminuida	Susceptible
Penicilina	≤ 26	27 - 46	≥ 47
Tetraciclina	≤ 30	31 - 37	≥ 38
Ceftriaxona	-*	-*	≥ 35
Cefotaxima	-*	-*	≥ 31
Cefuroxima	≤ 25	26 - 30	≥ 31
Ciprofloxacina	≤ 23	24 - 35	≥ 36

\* Criterio para susceptibilidad disminuida y resistencia a estas drogas no disponibles aún.

Fuente: NCCLS 1993.<sup>4</sup>

## RESULTADOS

La estandarización del método de difusión con discos frente a 6 antimicrobianos reveló que en todos los experimentos realizados por diferentes evaluadores, los valores de susceptibilidad correspondientes a la cepa de referencia *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 estaban dentro de los límites aceptados<sup>4</sup> (tabla 1).

Del total de cepas estudiadas, el 52 y el 34 % resultaron resistentes a la penicilina y a la tetraciclina, respectivamente y todas fueron susceptibles al resto de los antimicrobianos utilizados (tabla 3). Diez cepas (20 %) presentaron resistencia simultánea a la penicilina y a la tetraciclina (multiresistencia).

**TABLA 3.** Susceptibilidad antimicrobiana de 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

Antimicrobianos	Susceptible (%)	Susceptibilidad disminuida (%)	Resistente (%)
Penicilina	32	16	52
Tetraciclina	58	8	34
Ceftriaxona	100	–	–
Cefotaxima	100	–	–
Cefuroxima	100	–	–
Ciprofloxacina	100	–	–

Fuente: Laboratorio de Gonococo del IPK, 1997.

## DISCUSIÓN

En Cuba se han realizado escasos estudios de la susceptibilidad de las cepas de *N. gonorrhoeae* a las drogas antimicrobianas<sup>5</sup> (Duque AC, Congreso 50 Aniversario del IPK, 1988), en los que se han utilizado medios de cultivo como agar chocolate o agar Thayer Martin, los cuales en la actualidad no se recomiendan para este fin.<sup>4,6</sup>

Las cifras de resistencia y multiresistencia a la penicilina y la tetraciclina en este estudio son comparables con aquéllas obtenidas en algunos países de Asia y África,<sup>7,8</sup> aunque inferiores a la resistencia encontrada en Filipinas,<sup>9</sup> Nigeria<sup>10</sup> y Jamaica.<sup>11</sup> Estos antibióticos son ampliamente utilizados en Cuba para el tratamiento de diversas infecciones y constituyen las drogas de elección en la terapéutica de la enfermedad gonocócica desde hace más de 20 años (Ministerio de Salud Pública, Programa de Control de la Blenorragia en Cuba.

Actualización de 1997), lo que pudiera explicar la elevada resistencia encontrada.

Las fluoroquinolonas, la ceftriaxona y otras cefalosporinas forman parte de los agentes antimicrobianos recomendados por la Organización Mundial de la Salud para tratar las infecciones gonocócicas, dada su elevada efectividad frente a *N. gonorrhoeae*,<sup>12,13</sup> esto resulta válido para las cepas cubanas. Se debe señalar que estas drogas apenas han sido empleadas en Cuba en la terapéutica de la gonorrea, ésta pudiera ser una de las razones que explicaría la total susceptibilidad de las cepas estudiadas.

El resultado de la evaluación del método de difusión con discos de antimicrobianos en que se empleó el medio agar base GC más suplemento y su posterior aplicación al estudio de cepas de *N. gonorrhoeae* circulantes en Cuba, indican la factibilidad de ésta cuando se investigue la susceptibilidad *in vitro* a la penicilina, a la tetraciclina, a la cefuroxima, a la ceftriaxona, a la cefotaxina y a la ciprofloxacina. Teniendo en cuenta estos aspectos, las ventajas del método y el disponer de la cepa de referencia para el estudio, se recomienda la utilización de este método en la vigilancia de la susceptibilidad de las cepas de gonococo a estas drogas en Cuba.

## SUMMARY

The Gonococcus Laboratory of "Pedro Kouri" Tropical Medicine Institute carried out a study of *in vitro* susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, cefuroxime ceftriaxone, cefotaxine and ciprofoxacin by means of a disk diffusion method with the culture medium agar base GC plus supplement. In the first phase, the method was standardized and the reference *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 strain was used whereas in the second phase, 50 gonococcal strains isolated in 8 provinces during 1995 and 1996 were examined. The results of such standardization confirmed that the antimicrobial susceptibility values were within the allowable limits. 52 and 34 % of strains were resistant to penicillin and tetracycline respectively and all of them showed susceptibility to the rest of evaluated antimicrobial drugs. We recommend the use of the disk diffusion method for surveillance of gonococci resistance to these drugs in our country.

**Subject headings:** NEISSERIA GONORRHOEAE; BACTERIA; DRUG RESISTANCE; TETRACYCLINE RESISTANCE; PENICILLIN RESISTANCE.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Savahtaheri S, Steele I, Dryla D, Furness K. Evaluation of interpretive criteria of agar dilution and disk diffusion susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;(18):175-80.
2. Llanes R, Sosa J, Martínez I, Llop A, et al. Antimicrobial susceptibility of 42 *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in 1995 in Cuba. En: Zollinger WD, Frasch C, Deal CD. *Proceeding Abstracts of the X International Pathogenic Neisseria Conference*. Baltimore: 1996:52-4.
3. Biedenbach DJ, Jones RN. Comparative assessment of E test for testing susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, ceftriaxone, cefotaxime, and ciprofloxacin: investigation using 510 (k) review criteria recommended by the Food and Drug Administration. *J Clin Microbiol* 1996;(30):3214-7.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1993. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 5 de. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova. Pa.
5. Ortega B. Estudio de la sensibilidad del gonococo a diferentes antibióticos. *Rev Cubana Med Trop* 1976;(28):29-34.
6. Fekete T. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* and implications for epidemiology and therapy. *Clin Microbiol Rev* 1993;(6):22-3.
7. Laga M. Epidemiology and control of sexually transmitted diseases in developing countries. *Sex Transm Dis* 1994;(Suppl):S45-9.
8. Desai DJ, Morrison JA, Fleming AF. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Ndola, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;(84):131.
9. Knapp JS, Mesola VP, Neal SW. Molecular epidemiology, in 1994 of gonococci in Manila and Cebu, Republic of Philippines. *Sex Trans Dis* 1997;(24):2-7.
10. Osoba AO, Johnston NA, Ogunbanjo BO, Ochei J. Plasmid profile of *Neisseria gonorrhoeae* in Nigeria and efficacy of spectinomycin in treating gonorrhoea. *Genito urin Med* 1987;(63):1-5.
11. Knapp JS, Brathwaite AR, Hinds A, Duncan W, Rice RJ. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Kingston, Jamaica: 1990-1991. *Sex Transm Dis* 1995;(22):155-9.
12. Chenia HY, Pillay B, Hoosen AA, Pillay D. Antibiotic susceptibility patterns and plasmid profiles of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Durban, South Africa, 1990-1993. *Sex Transm Dis* 1997;(24):18-22.
13. Moran JS, Levine WC. Drugs of choice for the treatment of uncomplicated gonococcal infections. *Clin Infect Dis* 1995;20(Suppl 1):S47-55.

Recibido: 19 de diciembre de 1997. Aprobado: 18 de septiembre de 1998.

Dr. Rafael Llanes Caballero. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13. E.mail: ciipk@infomed.sld.cu