

## Artículo original

# Susceptibilidad antimicrobiana y producción de betalactamasa en aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*, Cumaná, estado Sucre, Venezuela, 2008-2009

Evelin Margarita Flores Fernández\*, Yubexi Carolina Márquez Planché, Luzmila Sofia Albarado Ysasis

*Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, Venezuela.*

Recibido 29 de noviembre de 2011; aceptado 29 de marzo de 2012

**Resumen:** La vigilancia de la sensibilidad antibiótica de *Neisseria gonorrhoeae*, permite conocer la aparición de gonococos resistentes a determinado antimicrobiano en cada región, conduciendo así a la elección de la terapéutica adecuada. Este estudio evaluó la susceptibilidad antimicrobiana, por el método de difusión de disco, a ceftriaxona, cefoxitina, penicilina, tetraciclina y ciprofloxacina, así como la producción de betalactamasa en aislamientos de *N. gonorrhoeae*, provenientes de pacientes de tres centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela, 2008-2009. Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* presentaron elevada resistencia a penicilina 19/20 (95%) y tetraciclina 18/20 (90%), no hubo resistencia a ceftriaxona, ni a cefoxitin y un alto porcentaje (89,5%) fueron productores de betalactamasa. Se recomienda no emplear ciprofloxacina en el tratamiento empírico de la gonorrea hasta que los resultados de las pruebas de sensibilidad estén disponibles y se sugiere el uso de ceftriaxona y cefoxitina como los antibióticos de primera línea para tratar la gonorrea en Cumaná.

**Palabras clave:** *Neisseria gonorrhoeae*, susceptibilidad antimicrobiana, betalactamasa.

## Antimicrobial susceptibility and betalactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*, Cumana, Sucre State, Venezuela, 2008-2009

**Abstract:** Surveillance of antibiotic sensitivity in *Neisseria gonorrhoeae* allows to recognize the occurrence of resistant gonococci towards certain antimicrobials at each region, leading to the choice of adequate therapies. This study evaluated antimicrobial susceptibility through the disk-diffusion method towards ceftriaxone, cefoxitin, penicillin, tetracycline, and ciprofloxacin, as well as betalactamase production in *Neisseria gonorrhoeae* of patients from three health centers of the city of Cumana, Sucre State, Venezuela, 2008-2009. *N. gonorrhoeae* isolates presented high resistance to penicillin 19/20 (95%), and tetracycline 18/20 (90%); there was no resistance to ceftriaxone nor to cefoxitin, and a high percentage (89,5%) were betalactamase producers. It is recommended not to use ciprofloxacin in empiric gonorrhea treatment until the results of sensitivity tests are available, and the use of ceftriaxone and cefoxitin is suggested as first line antibiotics for treating gonorrhea in Cumana.

**Keywords:** *Neisseria gonorrhoeae*, antimicrobial susceptibility, betalactamase.

\* Correspondencia:

E-mail: eve\_linff@yahoo.com

### Introducción

La gonorrea es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más comunes a nivel mundial con, aproximadamente, 62,2 millones de infectados por año [1]. Dos factores importantes responsables de la alta prevalencia son el incremento de la resistencia antimicrobiana y la presencia de infecciones asintomáticas [2].

La emergencia de la resistencia bacteriana a antimicrobianos y su diseminación es una de las mayores epidemias del mundo en la actualidad. Desde el punto de vista histórico,

se han probado muchos tratamientos para la gonorrea, pero no fue hasta el advenimiento de las sulfamidas, en la década de 1930 y de la penicilina en 1948, que se contó con un tratamiento verdaderamente eficaz [3,4].

En la década de 1970, comenzó el aumento de la resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* a penicilina y debido al predominio de estas cepas se consideró el uso de tetraciclina y espectinomicina. Progresivamente, estos antimicrobianos dejaron de ser la primera línea de elección para el tratamiento de la enfermedad, al no mostrar los resultados terapéuticos esperados, observándose

comprometida su eficacia debido a la capacidad de *N. gonorrhoeae* de desarrollar mecanismos de resistencia cromosómica y mediada por plásmidos [3,5-7].

A partir de 1985, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) incluyó la ceftriaxona como terapia de primera línea en el tratamiento de la gonorrea y en 1993 recomendó el uso de las fluoroquinolonas [3,8].

La vigilancia continua de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos, constituye una de las principales tareas de los laboratorios bacteriológicos. Esta vigilancia permite conocer la situación de resistencia en cada región o país y la fecha de aparición de gonococos resistentes a determinada droga, lo que permite la elección de la terapéutica adecuada [5].

En diferentes regiones de Venezuela y el mundo, se han realizado investigaciones que demuestran el incremento de la resistencia de *N. gonorrhoeae*, siendo la producción de enzimas betalactamasas el mecanismo de resistencia más común de la bacteria frente a los antibióticos betalactámicos, teniendo esto importantes repercusiones clínicas y terapéuticas que han favorecido la prevalencia de la enfermedad y limitado las opciones terapéuticas. En el estado Sucre, no existe un esquema de tratamiento actualizado para combatir la enfermedad, así como tampoco datos que reflejen la frecuencia de aislamientos de *N. gonorrhoeae* productores de betalactamasa. En la presente investigación se planteó como objetivo evaluar la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión de disco y la producción de betalactamasa en aislamientos de *N. gonorrhoeae* en Cumaná, estado Sucre, Venezuela, en el periodo 2008-2009.

## Materiales y métodos

**Muestra poblacional:** Durante el periodo febrero 2008 a febrero 2009 fueron recolectadas por muestreo a conveniencia, sin distinción de sexo, ni edad, un total de 62 muestras de pacientes con sospecha clínica y noción epidemiológica de infección por *N. gonorrhoeae*, provenientes de los servicios de ginecología y urología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, ginecología del Ambulatorio “Salvador Allende” y centro de referencia ITS-SIDA del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Se consideró como criterio de exclusión, aquellos pacientes bajo tratamiento con antibióticos o haberlo recibido 72 horas previas a la toma de muestra. El estudio se efectuó bajo estrictas normas de ética médica, según la declaración de Helsinki ratificada por la 59ª Asamblea General de Seúl en 2008 [9] y fue aprobado por la Comisión de Trabajos de Grados y Ética de la institución.

**Recolección y transporte de las muestras:** Las muestras estudiadas fueron obtenidas por el personal médico de los diferentes centros de salud. A cada paciente se le tomaron dos muestras, una para realizar el cultivo y otra

para los frotis, donde se evaluó la presencia de diplococos mediante la coloración de Gram y la tinción diferencial de fluorescencia modificada [10]. Los frotis y muestras fueron trasladadas rápidamente al Departamento de Bioanálisis. Los hisopos para cultivo se trasladaron en medios Amies con carbón activado [11].

**Cultivo, aislamiento e identificación:** Los hisopos con las muestras se inocularon rodándolos en forma de Z sobre el medio selectivo gonococo (GC), luego con asa de platino estéril se realizó un estriado perpendicular sobre las líneas de la siembra. Las placas sembradas se incubaron en atmósfera de microaerofilia a 37 °C, inspeccionándolas a las 24, 48 y 72 horas [12]. La identificación de *N. gonorrhoeae*, se basó en el estudio de las características macroscópica y microscópica de las colonias, las pruebas de oxidasa, superoxol y utilización de hidratos de carbonos [10,11].

**Susceptibilidad antimicrobiana:** La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión de disco, en agar base GC (Difco, EUA) suplementado con 1% de isovitalax (Difco, EUA), siguiendo las normas, procedimientos y criterios establecidos por el CLSI [13]. Los discos de antibióticos empleados fueron: ceftriaxona 30 µg, cefoxitina 30 µg, penicilina 10 U, tetraciclina 30 µg y ciprofloxacina 5 µg. Se utilizó como cepa control *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.

**Producción de betalactamasa:** Se determinó utilizando el método de la cefalosporina cromógena, empleando discos impregnados con el sustrato nitrocefina (Oxoid, Inglaterra) [14].

**Análisis estadístico:** Los resultados obtenidos se expresaron en forma porcentual a través de tablas.

## Resultados y discusión

Se obtuvo un total de 20 (32,3%) aislamientos identificados como *N. gonorrhoeae* a partir de 62 secreciones de pacientes con manifestaciones clínicas sospechosas. Los resultados de la susceptibilidad de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos probados se muestran en la tabla 1.

Las cefalosporinas de tercera generación son recomendados como la primera línea de terapia para la gonorrea en ciertas regiones del mundo. La sensibilidad a ceftriaxona del 100%, presentada en este estudio, es similar a la encontrada en recientes estudios en diversas regiones como los de Srifeungfung *et al.* [4] en Tailandia, Carannante *et al.* [15] en Italia, Camponovo [16] en Chile, Farhi *et al.* [17] en París, García *et al.* [18] en Argentina, Olsen *et al.* [7] en Suecia. No obstante, recientemente, en Japón aparece la primera cepa resistente a ceftriaxona procedente de una trabajadora sexual [19]. Debido a la continua sensibilidad de *N. gonorrhoeae* al antimicrobiano ceftriaxona, éste sigue siendo el tratamiento de selección a nivel mundial.

Estudios actuales, llevados a cabo en Pakistán y Suráfrica,

Tabla 1. Susceptibilidad *in vitro* de 20 aislados de *Neisseria gonorrhoeae*, procedentes de pacientes que asistieron a tres centros asistenciales de Cumaná, estado Sucre, 2008–2009.

Antimicrobiano	Sensible		Resistente	
	n	%	n	%
Ceftriaxona*	20	100	-	-
Cefoxitina	20	100	0	0
Ciprofloxacina	15	75	5	25
Penicilina	1	5	19	95
Tetraciclina	2	10	18	90

n: número de aislados; %: porcentaje de aislados; \*: antimicrobiano sin criterio microbiológico de la categoría resistente.

evaluaron la susceptibilidad a cefoxitina, y al igual que en este trabajo, los aislamientos de gonococos permanecen sensibles [20,21].

La resistencia a ciprofloxacina fue del 25%, la susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a esta fluoroquinolona varía de un lugar a otro y los porcentajes de resistencia han aumentado desde 1994, reportándose a nivel mundial frecuencias de sensibilidad muy disminuidas [4,16,17,22]. En California y Hawai, las quinolonas no son usadas, debido a la alta prevalencia de *N. gonorrhoeae* resistente a ellas. En Cumaná, los resultados de esta investigación demuestran que la resistencia de *N. gonorrhoeae* a ciprofloxacina con el transcurrir del tiempo, se ha mantenido desde el 2003 con 21% al periodo 2008-2009 con 25% [23]. El principal determinante de resistencia a fluoroquinolonas en gonococos es la alteración de la ADN girasa por mutaciones espontáneas en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parC*. Los codones 91 y 95 de *gyrA*, y 86, 88 y 91 de *parC* son los más frecuentemente asociados con resistencia a quinolona en *N. gonorrhoeae* [24].

La penicilina y tetraciclina fueron los tratamientos de elección durante mucho tiempo para la gonorrea, actualmente, no se usan, puesto que, casi todos los autores reportan resistencia, encontrándose variaciones entre las diferentes regiones. Estudios realizados en otros países coinciden con los elevados porcentajes de resistencia a penicilina y tetraciclina hallados en esta investigación [20,25,26]. No obstante, países como Estados Unidos de América y Japón reportan una declinación de la resistencia de *N. gonorrhoeae* a penicilina y tetraciclina [27,28]. En Venezuela, Sandoval y col [3], refieren que la resistencia a penicilina, oscila entre 30-45% y entre 48-63% a tetraciclina. Más recientemente, el informe del programa de vigilancia y susceptibilidad de los gonococos a los agentes antimicrobianos en América Latina y el Caribe (GASP-LAC), el cual contiene los datos de susceptibilidad de los gonococos entre los años 2000-2009, señala que en Venezuela, hasta el año 2008, la resistencia a penicilina osciló entre 84-87%, y para tetraciclina entre 91-100% [29], coincidiendo con los hallazgos de la presente investigación. Del mismo modo, al comparar los resultados de este trabajo, con estudios dentro del ámbito

regional, concuerdan con los obtenidos por Lanz y col en Monagas con 94% de resistencia a penicilina y 97% de resistencia a tetraciclina [30]. En Cumaná, la resistencia de *N. gonorrhoeae* a penicilina se incrementó de 72% en el periodo 2002-2003 a 95% en el periodo 2008-2009, mientras que la resistencia a tetraciclina mostró poca variación, con 80% en el primer período y 85% en este estudio [23].

El 85% (17/20) de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* fueron productores de betalactamasa. Los resultados obtenidos coinciden con los hallazgos de Donegan *et al.* [26] quienes registraron un 97,5% (117/120) de aislamientos de *N. gonorrhoeae* resistentes a penicilina con betalactamasa positiva e, igualmente, son consistentes con un estudio hecho en Tailandia, donde el 83,6% (102/122) de los aislamientos resistentes a penicilina fueron positivos a la producción de betalactamasa [4]. Por otro lado, contrario a lo encontrado, otros estudios han reportado menores porcentajes de aislamientos productores de betalactamasa, como es el caso de una investigación realizada en Perú, entre 1998 y 1999, donde se reportó un 40,4% de *N. gonorrhoeae* productora de betalactamasa [31]. En Shangai, se encontró que un 51,6% de aislamientos de *N. gonorrhoeae* fueron positivos a betalactamasa [27]. Los betalactámicos son un grupo de antimicrobianos, cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de peptidoglicano de la pared bacteriana. La resistencia a penicilina por producción de betalactamasas es conferida por plásmidos que contienen genes involucrados en la producción de las enzimas, tales como *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>TEM-1-like</sub> [4].

El presente estudio determinó que los aislamientos de *N. gonorrhoeae* presentaron elevada resistencia a penicilina y tetraciclina, así como también un alto porcentaje de ellos son productores de betalactamasa, sugiriéndose el uso de ceftriaxona y cefoxitina como los antibióticos de primera línea para tratar la gonorrea en Cumaná y el antibiótico ciprofloxacina no debe emplearse en el tratamiento empírico de la gonorrea si los resultados de las pruebas de sensibilidad no están disponibles. De igual modo, se recomienda, mantener una vigilancia y monitoreo de estos antibióticos por parte de las autoridades sanitarias del Estado, mediante programas de vigilancia epidemiológica y control de la población en riesgo, para así poner de manifiesto la aparición de resistencia y ser capaces de actualizar las recomendaciones terapéuticas de forma regular.

### Agradecimientos

Al personal médico y equipo de trabajo de los servicios de ginecología y urología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, ginecología del Ambulatorio “Salvador Allende” e ITS-SIDA del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” por la colaboración prestada en la obtención de las muestras.

### Referencias

1. Furuya R, Tanaka M. *Neisseria gonorrhoeae* infections.

- Nippon Rinsha. 2009; 62:129-35.
2. Khaki P, Bhalla P, Sharma P, Chawla R, Bhalla K. Epidemiological analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates by antimicrobial susceptibility testing, auxotyping and serotyping. Indian Med Microbiol. 2007; 25:225-9.
  3. Sandoval M, Guevara A, Ward L, Ramos R, Suárez Y, Salomón M. Susceptibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina y quinolonas. Kasmera. 2007; 35:1-8.
  4. Srifeungfung S, Roongpisuthipong A, Asavapiriyant S, Lolekha R, Tribuddharat C, Lokpichart S *et al.* Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive patients and gonococcal antimicrobial susceptibility: an update in Thailand. Jpn J Infect Dis. 2009; 62:467-70.
  5. Otero L, Villar H, Vázquez JA, Vázquez F. *Neisseria gonorrhoeae* resistente a quinolonas: un nuevo problema de salud pública en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; 20:123-6.
  6. Belda WJ, Velho PE, Fagundes LJ, Armone M. Evaluation of the *in vitro* activity of six antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007; 49:55-8.
  7. Olsen B, Hadad R, Fredlund H, Unemo M. The *Neisseria gonorrhoeae* population in Sweden during 2005-phenotypes, genotypes and antibiotic resistance. Sex Trans Infect. 2008; 116:181-9.
  8. Morales D, Gallegos B, Luengo H, Galué M, Vargas J. Resistencia antimicrobiana y producción de betalactamasa de *Neisseria gonorrhoeae*. Kasmera. 2002; 30:145-55.
  9. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki: principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 59<sup>na</sup> Asamblea General, Seúl, Corea, octubre de 2008.
  10. Flores E, Albarado L. Tinción diferencial de fluorescencia modificada en el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* y correlación clínico tintorial del gonococo. Rev Salus. 2009; 13:39-50.
  11. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.
  12. Pardi G, Pérez MF, Pacheco A, Mata M. Algunas consideraciones sobre *Neisseria gonorrhoeae*. Acta Odontol Venez. 2004; 42:122-7.
  13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for diffusion antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. M100-S19. Villanova: USA; 2009.
  14. Tu K, Jorgensen J, Stratton C. A rapid paper disk for penicillinase. Am J Clin Pathol. 1981; 75:557-9.
  15. Carannante A, Prignano G, Cusini M, Matteelli A, Dal Conte I, Ghisetti V *et al.* Cefixime and ceftriaxone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Italy from 2006 to 2010. Clin Microbiol Infect. 2011; DOI: 10.1111/j.1469-0691.
  16. Camponovo R. Susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos. Especies aisladas en pacientes ambulatorios de la Región Metropolitana, Chile, año 2007. Rev Chil Infect. 2009; 26:18-20.
  17. Farhi D, Hotz C, Poupert H, Gerhardt P, Morand P, Poyart C *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* antibiotic resistance in Paris, 2005 to 2007: implications for treatment guidelines. Act Derm Venereol. 2009; 89:484-7.
  18. García S, Casco R, Perazzi B, De Mier C, Famiglietti A. Resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacina según hábitos sexuales. Medicina, 2008; 68:358-62.
  19. Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Watanabe H *et al.* Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. Emerg Infect Dis. 2011; 17:148-9.
  20. Jabeen K, Nizamuddin S, Irfan S, Khan E, Malik F, Zafar A. Increasing trend of resistance to penicillin, tetracycline, and fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* from Pakistan (1992-2009). J Trop Med. 2011; 2011:960501.
  21. De Jongh M, Dangor Y, Adam A, Hoosen AA. Gonococcal resistance: evolving from penicillin, tetracycline to the quinolones in South Africa-implications for treatment guidelines. Int J STD AIDS. 2007; 18:697-9.
  22. Tanaka M, Shimojima M, Saika T, Iyoda T, Ikeda F, Kanayama A, Kobayashi I. Nationwide antimicrobial susceptibility survey of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan. Kansenshogaku Zasshi. 2011; 85:360-5.
  23. Figuera, T. 2004. Serotificación y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* en pacientes sexualmente activos provenientes del ambulatorio "Dr. Arquímedes Fuentes Serrano", Cumaná estado Sucre. Trabajo de Grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
  24. Vernel-Pauillac F, Hogan TR, Tapsall JW, Goarant C. Quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: rapid genotyping of quinolone resistance-determining regions in *gyrA* and *parC* genes by melting curve analysis predicts susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:1264-7.
  25. Sosa J, Ramírez S, Rubén M, Li H, Llanes R, Llop A *et al.* High percentages of resistance to tetracycline and penicillin and reduced susceptibility to azitromycin characterize the majority of strain types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Cuba, 1995-1998. Sex Trans Dis. 2003; 30:443-8.
  26. Donegan EA, Wiragan DN, Mulliawam P, Schachter J, Moncada J, Patekh M *et al.* Fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Bali, Indonesia. Sex Trans Dis. 2006; 33:625-9.
  27. Yang Y, Liao M, Gu WM, Bell K, Wu L, Eng NF *et al.* Antimicrobial susceptibility and molecular determinants of quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Shanghai. J Antimicrob Chemother. 2006; 58:868-72.
  28. Wang SA, Harvey AB, Conner SM, Zaidi AA, Knapp JS, Whittington WL *et al.* Antimicrobial resistance for *Neisseria gonorrhoeae* in the United States, 1998 to 2003: the spread of fluoroquinolone resistance. Ann Intern Med. 2007; 147:81-8.
  29. Programa de vigilancia de la susceptibilidad de los gonococos a los agentes antimicrobianos en América Latina y el Caribe. Informe del encuentro taller para revitalizar el programa de vigilancia de la susceptibilidad de los gonococos a los agentes antimicrobianos en América Latina y el Caribe (GASP-LAC). 2011. Universidad de Saskatchewan. Saskatoon, Canadá.
  30. Lanz J, De Freitas H, Betancourt J, Nuñez N, Velásquez W. Susceptibilidad antimicrobiana y producción de  $\beta$ -lactamasas en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en pacientes del Hospital Universitario "Dr. Manuel Nuñez Tovar", estado Monagas, Venezuela. Kasmera. 2004; 32:27-35.
  31. Portilla J. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* procesadas en el Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú, 1998-1999. Rev Peru Med Exp Sal Pub. 2003; 20:1-2.