

ESTUDIO DE PLASMIDOS EN CEPAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA A LA PENICILINA.

Jorge Sosa Puente, Ana Sonia Patton Narisy, Isabel Martínez Motas.

Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas, Subdirección de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba.

RESUMEN

Durante los años 1990, 1991, 1992 se encontraron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Neisseria meningitidis, 8 cepas procedentes de enfermos con sensibilidad intermedia a la penicilina (CMI 0.3 y 0.6 ug/ml); las mismas se clasificaron como B4: P1-15 y en todas se llevó a cabo la determinación de actividad betalactamasa por el método iodométrico y la búsqueda de plásmidos que pudieran ser responsables de dicha resistencia. Los resultados obtenidos con ambos métodos fueron negativos.

Palabras Claves: Neisseria meningitidis, betalactamasa, plásmidos, método iodométrico.

ABSTRACT

During the years 1990, 1991 and 1992, eight strains obtained from patients who had intermediate sensibility to penicilin (CMI 0,3 - 06 ug/ml) were found in the National Laboratory of Reference of Meningococcus of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kourí". These strains were classified as B4: P1.15 and in all of them the activity of the beta-lactamase was determined using the iodometric method and searching for the possible plasmides which could be responsible of such resistance. The results obtained from both investigations were negative.

Key Words: Neisseria meningitidis, betalactamase, plasmides, iodometric method.

INTRODUCCION

La enfermedad meningocócica es endémica o epidémica en cualquier parte del mundo, tanto en climas templados como tropicales, siendo entonces una causa importante de morbilidad y mortalidad (1,2). En Cuba, durante muchos años, esta patología se convirtió en un agobiante problema de salud, con una epidemia que comenzó a finales de la década del 70. En 1976, el brote estaba causado principalmente por el meningococo serogrupo C. Después de una inmunización masiva, con la vacuna francesa de polisacárido A - C, la incidencia continuó en ascenso pero a expensas del

serogrupo B. El pico de la epidemia ocurrió en 1983, con una tasa de 14.4/100.000 habitantes. En el año 1988 comienza a administrarse la vacuna cubana Vamengoc B - C, disminuyendo el número de casos hasta alcanzar en 1993 una tasa de 0.6/100.000 habitantes (3).

Si bien son importantes todos los esfuerzos destinados a la disminución de la incidencia de esta enfermedad, relevantes y necesarios son también los que apuntan hacia la vigilancia del comportamiento de la resistencia de las cepas de N. meningitidis que circulan en el país, a los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de dicha enfermedad (4).

En este trabajo se estudió el comportamiento de las cepas con respecto a la penicilina, que ha sido y es hasta estos momentos, el antibiótico de elección en el tratamiento de la enfermedad meningocócica (5).

La resistencia a la penicilina puede deberse a tres mecanismos (6,7,8): producción de beta-lactamasas (penicilinasas), alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplásmica, con la consiguiente escasa penetración del antimicrobioano y modificaciones en una o más proteínas fijadoras de la penicilina (PBP), lo que disminuye la interacción con el antibiótico.

En las últimas décadas han aparecido cepas moderadamente resistentes a la penicilina (MRP), con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 0.1 - 0.8 ug/ml, y francamente resistentes a la penicilina (CMI > 0.8 ug/ml) que es la concentración de este antibiótico que se alcanza en el líquido cefalorraquídeo (LCR), lo que ha llevado al establecimiento e incremento de la vigilancia por parte de los laboratorios de referencia, de las cepas recibidas, a través de la determinación de la CMI; de la actividad de la beta-lactamasa y presencia de plásmidos (9).

Las cepas con cifras de resistencia moderada, constituyen prácticamente un hallazgo de laboratorio por el momento, puesto que se han descrito sólo uno o dos casos con fallos terapéuticos, en embargo, cabe destacar la aparición de cepas con cifras de resistencia más elevadas, como consecuencia de alteraciones de

otras PBP y/o de la permeabilidad de la membrana externa, con la correspondiente aparición de fracasos terapéuticos (9,10).

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 8 cepas de *N. meningitidis* procedentes de enfermos, recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), en el período comprendido de Enero de 1990 a Diciembre de 1992 y que tuvieron una CMI de 0.3 y 06 ug/ml; los mayores valores encontrados dentro del rango de cepas moderadamente resistentes que se obtuvieron (Tabla N° 1).

TABLA N° 1 - Procedencia, serogrupo y valores de CMI de las cepas estudiadas 1990 - 1992.

CASOS	PROVINCIA	FECHA	FUENTE	SEROGRUPO SERTIPO	PENICILINA CMI - ug/ml
1	LJUVENTUD	4/90	LCR	B.4 P1:15	0.3
2	SANTIAGO	7/90	-	-	-
3	MATANZAS	8/90	-	-	-
4	GRAMMA	5/91	-	-	-
5	CIENFUEGOS	8/91	-	-	-
6	CAMAGUEY	3/92	-	-	-
7	CAMAGUEY	3/92	-	-	0.6
8	SANTIAGO	4/92	-	-	-

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de meningococo., IPK.

DETERMINACION DE LA CMI

Se utilizó el método de dilución en agar (11), utilizando el agar Mueller Hinton suplementado con suero de ternera al 7,5% y conteniendo diluciones dobles de la droga, desde la concentración de 0.009 ug/ml hasta 2.4 ug/ml; se incluyeron placas controles sin antibióticos.

La lectura se llevó a cabo después de 20 - 24 horas de incubación a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO2 y se consideró como CMI la dilución mayor que fué capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Se consideraron sensibles las cepas que crecieron a una concentración menor que 0.1 ug/ml y moderadamente resistentes las que fueron inhibidas por una concentración mayor o igual a 0.1 ug/ml.

PRUEBA DE DETECCION DE LA BETA-LACTAMASA.

Se utilizó el método iodométrico sobre tiras de papel. (12,13). Bandas de papel de filtro impregnadas de

almidón y bencil-penicilina, en el momento de su utilización se sumergieron en una solución de lugol, se dejó escurrir el exceso, después se tomaron varias colonias con asa estéril de platino y se dispusieron en la superficie del papel. La aparición de una coloración blanca en el lugar donde se había depositado el cultivo se dió como positivo, si permanecía igual, se daba como negativo.

PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO

Se utilizó el método descrito en el Protocols and Applications Guide Promega. (14,15).

Al ADN plasmídico aislado se le realizó una electroforesis en gel de agarosa (DNA/RNA LKB 2206 - 105) al 1%, en una cámara submarina (Hoefer Scientific Instruments, USA), utilizando un porta gel de 20 cms. de ancho por 25 de largo. De cada muestra se aplicaron 20 ul por pocillo y se efectuó la corrida a 35 volts. por período de 18 horas.

El marcador de corrida utilizado fué el azul de bromofenol. La visualización del ADN en el gel se obtuvo tiñendo el gel con una solución de 0.5 ul de bromuro de etidio, durante 45 minutos.

Conjuntamente a las cepas de estudio, se procesó una cepa *Escherichia coli* K12 portadora de un plásmido PBR procedente del "Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología", como control del método utilizado. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago Lambda (Amersham Lot. NIF 510) digerido con la enzima Hind III, el cual se aplicó en un pocillo en cantidad de 1 ug en un volumen total de 3 ul.

RESULTADOS Y DISCUSION

Hay pocas descripciones en la literatura de cepas de meningococo resistentes a la penicilina y las diversas citas se pueden agrupar de la siguiente manera:

- 1) Cepas productoras de beta - lactamasa, en Canadá, Sudáfrica y España (16,17, 18).
- 2) Algunos estudios dispersos de susceptibilidad a antimicrobianos en cepas en las que se obtuvieron CMI entre 0.1 y 0.25 ug/ml; la mayoría de ellas aisladas de portadores. (4,5,19).
- 3) Algunas descripciones de fracasos terapéuticos, sin documentación microbiológica (5,19).

Nuestro Laboratorio de Referencia posee datos acumulados de sensibilidad a los betalactámicos desde 1986 y, ya en ese mismo año, se encontraron cepas con resistencia moderada a la penicilina; no solamente el porcentaje de cepas con estas características ha ido en aumento, sino que también los valores de CMI se han incrementado de tal forma que si en un inicio no

sobrepasaban de 0.15 ug/ml, ya a partir de 1990 se alcanzaron valores de 0.3 y 0.6 ug/ml, según Patton et al. (20).

Al ser analizadas, ninguna de estas cepas fue productora de beta-lactamasa, ni portadora de alguna clase de plásmido (Foto).

La gran mayoría de los aislamientos clínicos con una CMI mayor o igual a 1 ug/ml, y que por ello son considerados francamente resistentes a la penicilina, son cepas productoras de beta-lactamasa y en una ocasión pudo encontrarse una portadora de un plásmido idéntico al que se ha aislado en cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, con un peso molecular aproximado de 4.5 Megadalton (16,17,21); la posibilidad de que esto ocurra en cepas con CMI entre 0.1 y 0.8 ug/ml, sobre todo en las de valores más cercanos a 0.8 ug/ml, es un hecho a tener en cuenta, que justifica la detección y búsqueda de beta-lactamasa y plásmidos respectivamente en esta población bacteriana.

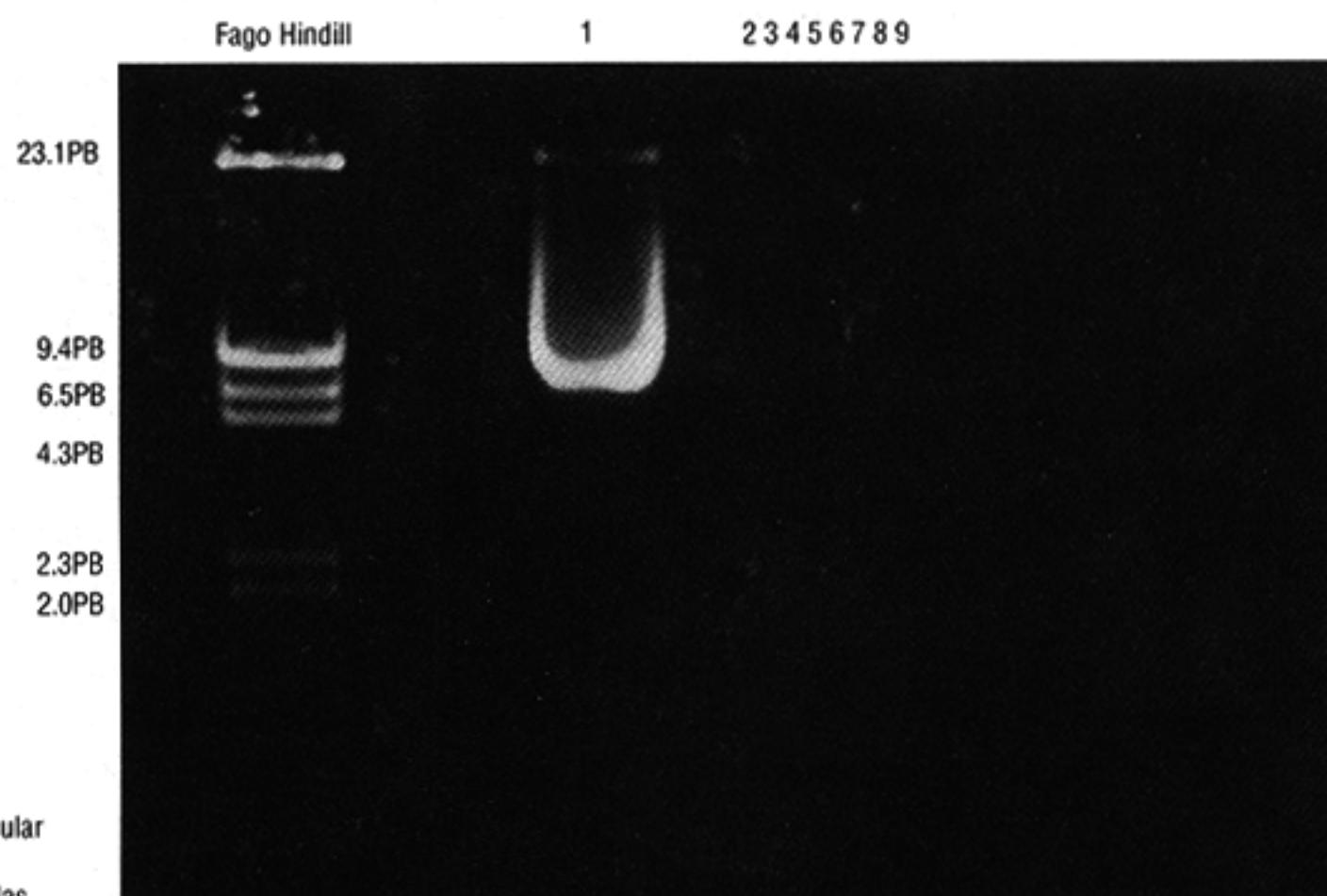
Hasta la fecha, sólo existen cuatro casos bien documentados de cepas con altos niveles de resistencia a la penicilina por la producción de beta-lactamasa y, en tres de ellos, aunque no se detectaron plásmidos, se sospecha esta posibilidad debido a las altas CMI exhibidas. Aún no existe la experiencia, in vitro, de la movilización de plásmidos portadores de la información

para la producción de penicilinas, desde el meningococo a otras cepas, con la participación de un plásmido conjugativo (16,17,22). Los resultados obtenidos en este estudio no se apartan de lo que es tratado con generalidad en la literatura relacionada. Así, los aislamientos clínicos de cepas de *N. meningitidis* con sensibilidad disminuída a la penicilina y que no producen beta - lactamasa, ya han sido reportados en Sudáfrica, España, Canadá e Inglaterra (9,23).

Tanto en España como en Reino Unido, ha habido un incremento en la frecuencia de aislamientos de cepas MRP, en un breve período de tiempo. Esto ha promovido el interés y preocupación de muchos investigadores, quienes se han dedicado al estudio de los posibles mecanismos de este fenómeno, por el peligro o la amenaza que representa el hecho de que este tipo de resistencia pueda deberse a la presencia de un plásmido, como elemento transferible por conjugación entre algunas cepas, siendo responsable de una rápida diseminación de la resistencia antimicrobiana en una población dada de microorganismos (9,10,16,19).

Es una suerte que la resistencia moderada a la penicilina no se asocie, por el momento, con la presencia de plásmidos, sino que se deba fundamentalmente a alteraciones en el gen pen A que codifica para la producción de la proteína fijadora de la penicilina 3

FOTO PATRON ELECTROFORETICO



- 1) Fago HindIII, marcador de peso molecular
- 2) 1, plásmido PBRen E. Coli.
- 3) 2-9 Cepas de *N. meningitidis* estudiadas

(PBP 3) (9,10).

Se ha sugerido la posibilidad, de que en este caso la transmisión de la resistencia (tipo cromosomal) ocurra por transformación genética de genes pen A, alterados por mutaciones, desde neisserias saprófitas hacia el interior de cepas de *N. meningitidis* naturalmente transformables, que comparten temporalmente su habitat (10,24).

Sáez - Nieto (1992) en un estudio con 138 cepas con susceptibilidad disminuída a la penicilina, no pudo demostrar la presencia de actividad de beta - lactamasa ni de plásmidos, corroborando en las mismas posteriormente una disminución en la afinidad de las PBP 3 (24). Parece probable que el desarrollo de la resistencia moderada a la penicilina en el meningococo siga el camino ya tomado por cepas de gonococo, en el que se han desarrollado además, formas alteradas de la PBP 1 que requieren CMI > 1 ug/ml. (24)

Hasta el momento actual, la resistencia moderada a la penicilina no se asocia a fracasos terapéuticos (19), pero la realidad de tener en nuestro medio cepas con estas características, nos alerta a mantener la vigilancia sobre las mismas y orientar, en caso de que fuera necesario, cualquier cambio en la conducta clínico - epidemiológica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Peltola, H. 1983. Meningococcal disease. Still with US. *Reviews of Infect. Dis.* 5(1): 71 - 91.
- 2.- MINSAP. Cuadro Epidemiológico Nacional. 1987 MINSAP; 1988.
- 3.- Valcárcel Novo, M.; Rodríguez Cruz, R.; Terry Molinert, H. 1991. La enfermedad meningocócica en Cuba. *Cronología.* Editorial Ciencias Médicas. C. Habana. Cuba.
- 4.- Sáez - Nieto, J.A. et al., 1987. Isolation of *Neisseria meningitidis* strains with increase of penicillin minimal inhibitory concentrations. *Epidem. Inf.* 99: 463 - 9.
- 5.- Mendelman, Paul M. et al., 1989, Genetic diversity of penicillin G-resistant *Neisseria meningitidis* from Spain. *Infect. Immun.*, 1025 -9.
- 6.- Hakembeck, T.M.; A. Tomás., 1980. Multiple changes of penicillin binding proteins in penicillin resistant clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 364 - 71.
- 7.- Dougherty, T.J., 1985. Involvement of change in penicillin target and peptidoglycan structure in low level resistance to beta-lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 90 - 5.
- 8.- Ashford, W.; R. Golash; V. Hemming 1976. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet.* 657 - 658.
- 9.- Berrón S.; J. A. Sáez - Nieto, J. A. Vázquez. 1992. Aplicación de marcadores epidemiológicos en cepas de *Neisseria meningitidis* con sensibilidad disminuida a la

- penicilina aisladas en España. *Rev. Esp. Quimioterap.* 5 (1): 35 - 41.
- 10.- Luján, R., 1990. Resistencia a penicilina en *Neisseria meningitidis*. *Epidemiología, bases moleculares e implicaciones terapéuticas.* *Rev. Esp. Quimioterap.* 3 (4): 323 - 329.
- 11.- Lennette, Edwin H. et al., *Microbiología clínica.* Tercera edición. Editorial Científico - Técnica. C. Habana. 1982. p. 152 - 172.
- 12.- Sorgenser, L.; J. C. Lee and G. A. Alexander. 1977. Rapid penicillase paper strip test for detection of beta - lactamase producing *Haemophilus influenzae* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 11: 1087 - 1088.
- 13.- Thomas, R. and David W. Towle, 1982. Evaluation of the rapid penicillin paper strip test for detection of betalactamase. *J. Clin. Microbiol.* 15 (2): 196 - 199.
- 14.- Titus, D., *Promega Protocols and Applications Guide.* Second Edition. Copyright. Marc - 1991.
- 15.- Asubel, F. M.; R. Brent; R. E. Kinston; D.D. Moore; J. C. Seidman; J. A. Smith and K. Struhl, 1989. *Curret Protocols molecular biology.* Greene Publishing Associates. Brooklyn, N. Y.
- 16.- Dillon, J.R.; M. Pauze; K.H. Yeung. 1983. Spread of penicillase proucing and transfer plasmid from gonococci to *Neisseria emningitidis*. *Lancet i:* p. 779 - 781.
- 17.- Broths, P., 1988. Penicillin resistance *Neisseria meningitidis* in Southem - Africa. *Lancet i:* p. 54.
- 18.- Fontanals, V. et al. 1989. Sepsis por *Neisseria meningitidis* resistentes a penicilina y productores de beta - lactamasa. *Med. Clin.* 92: 477.
- 19.- Sáez - Nieto. J.A.: J. Campos, 1988, Reistencia a antimicrobianos en *Neisseria meningitidis*. *Enf. Infec. y microbiol. Clin.* 6 (10), p. 450 - 453.
- 20.- Patton, A.S. y col. 1993. Estudio de la sensibilidad por Concentración Mínima Inhibitoria de cepas de *Neisseria meningitidis* durante un período de 7 años (186-1992). Trabajo presentado en el IV Congreso de Microbiología y Parasitología. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. C. Habana, Cuba.
- 21.- Fontanals, D. et al. 1989. Penicillin resistant betalactamase producing *Neisseria meningitidis* in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 90 - 91.
- 22.- Roberts, M.C. et al., 1989. Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisserias* species. *Clin Microbiol. Rev.* 2: 518 - 523.
- 23.- James D. M.; Sutcliffe, E.M., 1990. Meningococci with reduced susceptibility to penicillin. *Lancet.* 863 - 864.
- 24.- Sáez - Nieto, J.A. et al., 1992. Epidemiology and molecular basis of penicillin resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: A 5-Year History (1985-1989). *Clin Infect. Dis.* 14: 394 - 402.