

STAPHYLOCOCCUS PENICILINO-RESISTENTES

Por NESTOR MORALES VILLAZON, RICARDO A. MARGNI
y CARLOS A. SANCHEZ SUAREZ

Resistencia in vivo: Numerosos investigadores han señalado el hecho de que ciertas afecciones piógenas debidas al estafilococo, ofrecen marcada resistencia a la acción antibiótica de la penicilina, que en no pocas ocasiones resulta ineficaz.

La explicación del fenómeno que dan los autores, es que el germen adquiere esta propiedad, debido a que las dosis iniciales fueron insuficientes, motivando en el microbio una especie de hábito, que le permite desafiar cantidades de penicilina que de otra suerte le habrían resultado fatales. La prueba experimental la debemos a Schmidt y Sesler, (1943) los que inoculando a ratones blancos, dosis subcurativas de penicilina, luego de haberlos infectados con neumococcus I y II, consiguieron que paulatinamente estos gérmenes resistieran dosis que en otras circunstancias les habrían sido letales. Esta propiedad, según los autores de referencia, se transmitiría en forma hereditaria a las generaciones posteriores. Rammelkamp y Maxon (1942), observaron que estafilococos aislados de procesos piógenos, son capaces de resistir dosis elevadas de penicilina sin sufrir cambio apreciable en su biología. Así por ejemplo en un absceso axilar, el germen soportó hasta diez y ocho unidades Oxford, debido a que en el primer momento se utilizaron dosis pequeñas. En otro caso, diez y ocho inyecciones de penicilina en la cavidad de un empiema crónico, durante un período de sesenta y dos días, acrecentaron la resistencia más de cien veces.

Como consecuencia del genial descubrimiento de Fleming, que demostró que ciertos productos provenientes del cultivo del *Penicilium notatum*, eran capaces de destruir numerosos gérmenes patógenos con mayor seguridad y eficacia que cualquiera antiséptico, se abrigó la esperanza

de que múltiples entidades mórbidas desaparecieron total o parcialmente del cuadro de las que constituyen un peligro para la salud humana.

Desgraciadamente esta convicción está lejos de haberse confirmado en la práctica. Es indudable que hoy la ciencia cuenta con un arma de extraordinaria eficacia, pero es no menos cierto, que se han señalado numerosos fracasos, debido a la resistencia que los gérmenes ofrecen a la acción medicamentosa.

En lo que especialmente se refiere al estafilococo, estadísticas documentadas demuestran que existe un cierto porcentaje de afecciones piógenas, que no responden al tratamiento penicilínico.

Por el momento no es nuestra intención ocuparnos de hechos que están más allá de los límites asignados a este trabajo y solo a título ilustrativo, citaremos las estadísticas que publican Mary Baber y Mary Rozwadwsk Dowzenco en el número de "The Lancet" correspondiente al 23 de octubre del año ppdo. Los autores de referencia con el título "Infección causada por el Staphilococcus penicilino-resistente", dicen: sobre cien casos de infecciones piógenas debidas al estafilococo que fueron investigadas en un hospital de Londres, entre abril y junio de 1948, se comprobó que 58 eran penicilino resistentes, es decir un 58% mientras en el mismo nosocomio durante 1946 se encontró solo un 14,1% y un 38% en 1947. Estos datos que seguramente necesitarán nuevas comprobaciones, parecerían demostrar que con el correr del tiempo, aumenta el número de las cepas ante las que es ineficaz el antibiótico. Refiriéndose al tema Mary Barber del departamento bacteriológico del Hammersmith Hospital, en el número correspondiente al sábado 29 de noviembre de 1947 del "British Medical Journal" dice: que el aumento incesante de las cepas resistentes, es algo que debe llamar la atención de los estudiosos, por el peligro que representa y la necesidad que impone, de arbitrar medios para evitar la amenaza que este hecho significa en el dominio de la patología humana.

Divide las cepas en dos categorías; las originalmente resistentes y las que lo son después de la administración de grandes o pequeñas cantidades de antibiótico. La mayoría de las cepas tanto de uno como del otro grupo, demostraron ser productoras de penicilinas.

Respecto al origen de las cepas resistentes, las agrupa

en el siguiente cuadro: Tipo de infección en 38 enfermos de los que se aislaron cepas de *Staphylococcus piógenes* penicilino resistentes.

| | | | |
|-------------------------------|----|-------------------------------|---|
| Septicemia | 1 | Otitis media | 4 |
| Absceso extradural | 1 | Heridas operatorias infectad. | 3 |
| Osteomielitis | 1 | Infecciones puerpurales | 3 |
| Infecciones respiratorias ... | 8 | Lesiones superficiales | 5 |
| Infecciones del recién nacido | 12 | Tuberculosis del seno | 1 |

Resistencia in vitro: Investigadores de diferentes naciones, han logrado provocar la resistencia de gérmenes normalmente sensibles a la penicilina, mediante cultivos en medios a los que se añaden paulatinamente cantidades crecientes de antibiótico. Abrahn y colaboradores (1941) lograron por este medio en un período de nueve semanas, elevar hasta cien veces la resistencia del estafilococo Mc. Kee y Rake por su parte, consiguieron el mismo resultado con *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Diplococcus pneumoniae* I y II en los que mediante pasajes seriados, de 8 a 70, aumentó el nivel de resistencia de dos a seis mil veces. Conviene advertir que esta propiedad es más bien lábil y tiende a desaparecer en las generaciones posteriores. Refiriéndose al mismo tema, si bien en esfera diferente, Weley W. Spink y Viola Ferris (1944-1945), recuerdan que en anteriores estudios señalaron que cepas de estáfilo coagulasa positivos, ofrecían in vitro sensibilidad variable a la acción de la penicilina y que sometidas luego a concentraciones crecientes, se consiguió hacerlas fuertemente resistentes, si bien los cultivos posteriores demostraron que bastaban seis transplantes en agar simple, para que perdieran la propiedad adquirida; mientras que dos cepas que se habían demostrado resistentes in vivo, la mantuvieron indefinidamente. Esta observación, seguramente fundamental, imponía resolver si la propiedad adquirida in vitro era idéntica o no a la observada in vitro. Se puede afirmar que el estudio de este fenómeno ha sido fértil para la ciencia y ha conducido al descubrimiento de la penicilinasas, producto de naturaleza posiblemente enzimática y a la que hemos consagrado atención preferente; que será objeto de comunicaciones posteriores.

Respecto a este mismo capítulo creemos que no estará demás señalar la observación del Dr. A. Voureka del Instituto Wright Fleming, que en el "Bulletin Of America Sanitary Bureau" del 5 de mayo del año en curso dice: que los microbios que han demostrado resistencia a la penici-

lina, pueden recobrar en pocos minutos su sensibilidad primitiva, siempre que se les asocia con otros de distinta familia; por ejemplo: estafilococo resistentes se hacen sensibles, si se les añade *Streptococcus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella thypho* o *Diplococcus pneumoniae*.

CASOS CLÍNICOS. — En el mes de enero de 1945 uno de nosotros tuvo ocasión de atender a la señora E. H. de K., de 43 años, sin datos anamnésicos de importancia, la que en el momento del examen presentaba al nivel de la región axilar izquierda, un forúnculo del que fluía abundante pus de color amarillento; la enferma hacía dos años que sufría de forúnculos a repetición, de los que fué atendida por distintos facultativos que la sometieron a una terapéutica activa, en la que recibió grandes cantidades de penicilina y sulfanilamidas, sin el menor éxito, hasta que se vió obligada a viajar al extranjero.

Otro caso fué el de S. A., de 24 años, de nacionalidad chilena, el que a raíz de una extirpación de amígdalas, tuvo una intensa forunculosis, de la que no logró mejorar no obstante las grandes dosis de antibióticos que por prescripción facultativa se le inocularon. Este paciente curó gracias a la autovacuna.

MATERIAL DE EXPERIENCIA. — De ambos casos se aisló estáfilo dorado al estado de pureza. Con el fin de averiguar si eran in vitro resistente como se habían demostrado en vivo, se hicieron las experiencias que se detallan más adelante y como elemento de comparación, se eligieron las cepas 2 y 46 de la colección, la primera de origen desconocido y la segunda sumamente toxigena y que se utiliza para preparar el toxoide. Los gérmenes en estudio, se marcaron con las letras M y CH respectivamente.

SOLUCIÓN DE PENICILINA. — Se tomaron dos miligramos exactamente pesados de la sal sódica cristalizada, disueltos en una cantidad buffer suficiente para que ésta contenga 32 unidades Oxford por centímetro cúbico. La fórmula del solvente es la que sigue: Solución: I (KH₂PO₄)— Solución II (K₂HPO₄) ambas en agua bidestilada y a la concentración del 1 %. Las soluciones se mezclan en una proporción tal que el PH sea 6,8. Se guarda el líquido saturándolo con cloroformo y en estas condiciones la actividad no se altera por varias semanas. En el momento de empleo se toman 0,50 cc. de la solución stock, diluyéndola con 7,50 cc. del Buffer. Para facilitar la expe-

riencia conviene contar con una escala de diluciones que contengan cantidades decrecientes de unidades Oxford para lo que se procede como sigue:

| N ^o | Solución que contiene 2 unidades Oxford por cm ³ . | Solución buffer | Concentración final en unidades Oxford |
|----------------|---|-----------------|---|
| 1 | 2,00 ml. | 0 ml. | 2,00 |
| 2 | 1,60 " | 0,40 " | 1,60 |
| 3 | 1,20 " | 0,80 " | 1,20 |
| 4 | 0,80 " | 1,20 " | 0,80 |
| 5 | 0,50 " | 1,50 " | 0,50 |
| 6 | 0,20 " | 1,80 " | 0,20 |

Estas diluciones deben guardarse en la heladera hasta pocos minutos antes de usarlas.

Tubos con cinco centímetros cúbicos de caldo, se siembran con 0,50 cc. de una suspensión del respectivo germen, previamente titulado por opacimetría a dos mil millones por centímetro cúbico y diluido al 1:10, por consiguiente cada tubo recibe cien millones. Inmediatamente se añaden dos unidades de penicilina al primer tubo, o lo que es igual un cm³. de la dilución N^o 1; 1,60 al segundo; 1,20 al tercero y así sucesivamente hasta el sexto que recibirá 0,20 cc. de la respectiva dilución. El séptimo tubo sirve de control. Con cada una de las cepas en experiencia se procede en igual forma. La lectura se hace después de veinticuatro horas de estufa a 37° C. Si no hubiera inhibición en ninguno de los tubos, se les repetirá usando dosis dobles de penicilina, es decir 4 unidades; 3,60; 3,20; 2,80; 2,50; y 2. De los tubos en los que aparentemente no hay enturbiamiento, se siembra una ansa en tubos con agar inclinado, con el fin de estar seguros de que la muerte de los estafilococos ha sido total.

En la Sección y con el fin de facilitar los cálculos procedemos como sigue:

I. — Cien mil unidades de la penicilina sódica cristalizada, se disuelven en 5 ml. de la solución buffer, cuya fórmula se ha dado anteriormente, por consiguiente cada ml. contiene veinte mil U. O.; es la solución madre.

II. — Se toman tres tubos con 4,5 cc. de la solución buffer cada uno, se añade al primero 0,50 cc. de la solución madre de penicilina; se mezcla y transfiere una cantidad igual al segundo y repitiendo la operación con el tercero; la concentración de este será de 20 U. O. por cm³.

Primera experiencia. — Siete tubos con cinco cen-

tímetros cúbicos de caldo se sembraron con 0,05 cc. de una suspensión del respectivo estáfilo con el título de 100 millones por cm^3 , es decir que cada tubo recibe 5 millones de gérmenes. Se añade luego las cantidades de penicilina consignados en el cuadro que sigue:

| Número de tubos | Cantidad que recibe de Solución de penicilina (20 U. O. x cc.) | Concentración final de penicilina |
|-----------------|--|-----------------------------------|
| 1 | 0.20 ml. | 4 U. O. |
| 2 | 0.16 " | 3,2 " |
| 3 | 0.12 " | 2,4 " |
| 4 | 0.08 " | 1,6 " |
| 5 | 0.04 " | 0,8 " |
| 6 | 0.02 " | 0,4 " |
| 7 | control | 0,0 " |

Para cada una de las cepas se procede en la misma forma y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Después de 48 horas de incubación a 37° C., los tubos en los que a simple vista se observó desarrollo o eran sospechosos, y el tubo anterior, se siembran en placas a la dosis de 0,05 ml. de cultivo.

Los tubos sembrados fueron los siguientes:

SERIE I

| <i>Staphylococcus aureus</i> N° 2 | Tubo N° | Número de colonias por placas |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| | 5 | 0 |
| | 6 | 12 |
| | 7 control | incontables |

SERIE II

| <i>Staphylococcus aureus</i> N° 46 | Tubo N° | Número de colonias por placas |
|------------------------------------|-----------|-------------------------------|
| | 5 | 0 |
| | 6 | 31 |
| | 7 control | incontables |

SERIE III

| <i>Staphylococcus aureus</i> Ch. | Tubo N° | Número de colonias por placas |
|----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| | 3 | 0 |
| | 4 | 41 |
| | 5 | 438 |
| | 6 | incontables |
| | 7 control | |

SERIE IV

| <i>Staphylococcus aureus</i> M | Tubo N° | Número de colonias por placas |
|--------------------------------|-----------|-------------------------------|
| | 2 | 0 |
| | 3 | 16 |
| | 4 | 74 |
| | 5 | 642 |
| | 6 | incontables |
| | 7 control | incontables |

La misma experiencia se repitió con dosis menores de penicilina, llegando a resultados similares.

Para completar los datos sobre la resistencia "in vitro" de las cepas en estudio, se procedió a la determinación del halo de inhibición, de acuerdo a la técnica Oxford para la valoración de penicilina y utilizando en cada caso, las diferentes cepas penicilino resistentes.

La técnica utilizada y los resultados obtenidos fueron los que a continuación se detallan:

DILUCIONES: A un frasco de 100.000 Unidades Oxford de penicilina se le añade 5 ml. de solución buffer de pH. 6,8 (1 ml.: 20.000 U. O.).

Se preparan cuatro tubos a los que se les agrega respectivamente 4,75 ml.; 4,5 ml.; 4,5 ml. y 2,5 ml. de solución buffer. Al primer tubo se le adiciona 0,25 ml. de la solución de penicilina que contiene 20.000 U. O. por ml., se mezcla y transfiere 0,5 ml. al tubo N° 2; se mezcla y transfiere 0,5 ml. al tubo N° 3; se mezcla y transfiere 2,5 ml. al tubo N° 4. En este tubo la dilución es de 5 U. O. de penicilina por ml.

A parte se preparan seis tubos a los que se les incorpora

| <i>Tubo N°</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Soluc. buffer pH 6,8 | 0,20 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 1,8 |
| Soluc. penicilina de 5 U. O. x ml. | 2,0 | 1,6 | 1,2 | 0,8 | 0,4 | 0,2 |
| Concentración fina por cada 0,20 ml. en Unidad Oxford. | 0,1 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 1,0 |

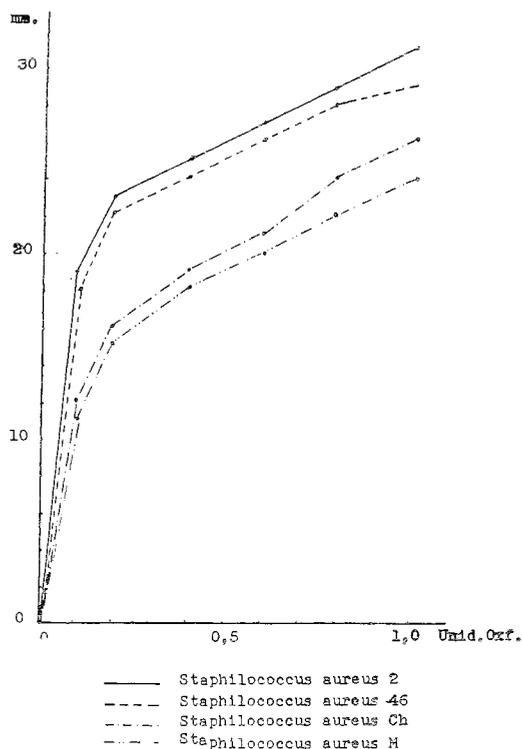
A cuatro matraces con 100 ml. de agar fundido y enfriado a 45° se les añade 0,10 ml. de cultivo en caldo de 24 horas de staphylococcus aureus 2; 46; Ch y M respectivamente. Se agita y de cada uno se extrae 26 ml. de la mezcla agar-gérmenes, la que se reparte en dos placas de Petri a la dosis de 13 ml. por placa. Las ocho placas fueron envueltas en papel de filtro y llevadas a la heladera hasta el día siguiente. Transcurrido este tiempo en cada una de las placas se colocan los seis aros de vidrio, según la técnica descripta para el método Oxford de valoración de penicilina, y a cada aro se le añade 0,20 ml. de las diferentes diluciones de penicilina. (Para poder efectuar bien estas medidas se utilizó goteros que daban por gota 0,05 ml.). Se marca el aro de dilución menor y siguiendo con las otras en con-

centración creciente y según el sentido de las agujas del reloj. Las experiencias se hicieron por duplicado; dos placas por cada cepa en estudio.

Las ocho placas se mantienen en estufa a 37° C. durante 24 horas, leyéndose luego los resultados.

LECTURA DE LOS RESULTADOS
(Gráf. N° 1 y N° 2)

| Concen- tración de peni- cilina en Unid. Oxford | Halo de inhibición en mm. | | | |
|--|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | Staphilococ- cus aureus 2 | Staphilococ- cus aureus 46 | Staphilococ- cus aureus Ch | Staphilococ- cus aureus M |
| 0,1 | | | | |
| 0,2 | | | | |
| 0,4 | | | | |
| 0,6 | | | | |
| 0,8 | | | | |
| 1,0 | | | | |
| Prome- dio Σ 6 | | | | |



| HALO DE INHIBICION EN mm. | | | | |
|--|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Concentración de penicilina en U. Oxford | Promedio Staphylococcus aureus 2 | Staphylococcus aureus 46 | Staphylococcus aureus Ch | Staphylococcus aureus M |
| 0,1 | 19 | 18 | 12 | 11 |
| 0,2 | 23 | 22 | 16 | 15 |
| 0,4 | 25 | 24 | 19 | 18 |
| 0,6 | 27 | 26 | 21 | 20 |
| 0,8 | 29 | 28 | 24 | 22 |
| 1,0 | 31 | 29 | 26 | 24 |
| Promedio $\frac{\sum}{\sigma}$ | 25,6 | 24,5 | 19,6 | 18,3 |

De acuerdo a los valores tabulados en el cuadro que antecede se establece que la diferencia en mm. de los promedios de los halos de inhibición correspondientes a las

cepas penicilino resistentes con las cepas 2 y 46 son las siguientes:

| <i>Cepa penicilino resistente</i> | <i>Diferencia en mm. de los halos de inhibición de as cepas</i> | |
|-----------------------------------|---|-----|
| | 2 | 46 |
| Ch | 6,0 | 4,9 |
| M | 7,3 | 6,2 |

C O N C L U S I O N E S

1) — Las dos cepas de estafilococo aisladas de casos que habían resistido a la acción medicamentosa de la penicilina, han demostrado que “in vitro” soportan también cantidades del antibiótico que son fatales para las cepas testigo.

2) — Esta propiedad parecería mantenerse indefinidamente.

3) — No existiendo en el país ningún estudio sobre el tema de que se ocupa el presente trabajo, sería de interés científico solicitar de los servicios de cirugía, de dos o más de nuestros hospitales, remitan a este Instituto el material de las infecciones de carácter piógeno resistente o no a la penicilina y sobre esta base establecer las respectivas estadísticas.