



2-9, No. 88
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTADO ACTUAL DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

PATRICIA PEREZ HERRERA

MEXICO, D. F.

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE QUÍMICA

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

INTRODUCCION.	2
1 GENERALIDADES.	
1.1 Problema de la presencia de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en enfermedades intrahospita- larias.	4
1.2 Antibióticos y agentes quimioterapéuti- cos.	27
1.3 Problema de la aparición de cepas resis- tentes de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> a los antimicrobianos.	37
1.4 Pruebas de susceptibilidad.	63
PARTE EXPERIMENTAL.	
I Material.	87
II Métodos.	89
III Resultados.	100
ANALISIS DE RESULTADOS.	106
CONCLUSIONES.	112
BIBLIOGRAFIA.	114

INTRODUCCION.

El grave problema de las infecciones nosocomiales cobra cada vez mayor importancia, debido a que el marcado incremento en la resistencia que vienen presentando las cepas causales, ha dificultado aún más su erradicación.

Dentro de los principales agentes etiológicos en cuestión, se encuentra uno cuya incidencia es máxima: Pseudomonas aeruginosa, microorganismo que posee requerimientos nutricionales tan simples, que puede multiplicarse prácticamente en cualquier ambiente húmedo que contenga cantidades mínimas de compuestos orgánicos; esta facilidad de desarrollo y su resistencia frente a numerosos desinfectantes y antibióticos, son factores esenciales para que frecuentemente se encuentre causando padecimientos en la especie humana.

Pseudomonas aeruginosa origina padecimientos de gravedad, entre los que se cuentan: otitis, oftalmías y las infecciones en quemaduras y heridas traumáticas que, tratadas a tiempo y adecuadamente, pueden erradicarse y enfermedades mortales como septicemias y meningitis. El hecho de que fácilmente puede desarrollar resistencia provoca problemas muy serios en los hospitales, principalmente en aquellas áreas en las que se prestan servicios de tipo quirúrgico y tratamientos de quemaduras, unidades de terapia intensiva o en las que se emplean equipos de diálisis, respiradores, catéteres, etc.

Expuesto lo anterior, el estudio de su susceptibilidad en el momento actual tiene gran importancia, ya que constituye el cami-

no más adecuado para lograr un tratamiento tal, que permita resolver las necesidades de control de las infecciones intrahospitalarias, induciendo lo menos posible el desarrollo de cepas resistentes a más agentes antimicrobianos.

Por otro lado, es además indispensable crear conciencia de las situaciones clínicas y epidemiológicas que se relacionan con el incremento de las enfermedades intrahospitalarias.

1 GENERALIDADES.

1.1 PROBLEMA DE LA PRESENCIA DE Pseudomonas aeruginosa EN ENFERMEDADES INTRAHOSPITALARIAS.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo, cuyo hábitat natural en general está representado por el agua y el suelo; se encuentra sólo en el conducto intestinal de un 10 % de individuos, y en forma esporádica, en las zonas húmedas de la piel (axila, ingle) y en la saliva. Ya que sus necesidades nutricionales son simples y puede utilizar gran variedad de fuentes de carbono, Pseudomonas aeruginosa puede multiplicarse prácticamente en cualquier ambiente húmedo que contenga tan sólo cantidades mínimas de compuestos orgánicos, por ejemplo, en los colirios, en las soluciones antisépticas débiles, en el jabón, en los equipos de anestesia y resucitación, en los fregaderos, en los carburantes, en los humidificantes e incluso en el agua destilada (9).

En base a esta facilidad de desarrollo, este microorganismo es frecuentemente aislado a partir de diversas lesiones de la especie humana y a pesar de que su presencia en infecciones humanas durante mucho tiempo fué considerada como insignificante; actualmente, debido a su resistencia frente a numerosos antibióticos, no es raro que se convierta en dominante a consecuencia de la supresión de la flora normal y de bacterias más sensibles. De ahí que, con la introducción de los antibióticos de amplio espectro, Pseudomonas aeruginosa ha pasado a ser uno de los

agentes principales de enfermedades hospitalarias, especialmente en individuos debilitados por procesos crónicos y en pacientes tratados (o tratados en exceso) con antibióticos de amplio espectro o con corticoesteroides (9).

Patogenicidad de Pseudomonas aeruginosa.

Ps. aeruginosa da lugar a enfermedades del tracto urinario (cuando se introduce en estas cavidades comúnmente estériles), infecciones de quemaduras y de heridas (es el agente causal del pus azul), casos de bacteremia y septicemia principalmente en huéspedes comprometidos, abscesos, otitis externa, otitis media o mastoiditis generalmente como sobreinfección, ulceraciones de la córnea comúnmente posteriores a abrasiones traumáticas oculares; el uso de lentes de contacto o líquido de lentes contaminado, pueden ser factores importantes en el desarrollo de enfermedades oculares, puede causar neumonía aunque en forma poco frecuente, así como enfermedades pulmonares a menudo asociadas con el desarrollo de microabscesos, por lo que los pacientes con fibrosis quística son particularmente susceptibles a desarrollar enfermedad supurativa pulmonar con Pseudomonas; la meningitis generalmente es consecuencia de infecciones introducidas en el espacio subaracnoideo por punción lumbar, anestesia espinal, medicación intratecal o trauma de la cabeza, pueden desarrollarse también casos de endocarditis bacteriana debido a Pseudomonas como resultado de cirugía a corazón abierto (generalmente los microorganismos se implantan en la seda de sutura) y más recientemente se han encontrado endocar-

ditis por Pseudomonas en válvulas de corazón normales de pacientes con quemaduras o drogadictos, estos últimos se han reportado también susceptibles a osteomielitis (9, 14).

Factores Patogenéticos de Pseudomonas aeruginosa.

Glicocálix.

En los últimos años ha habido un descubrimiento excepcional en el entendimiento de cuáles son los factores involucrados en la atracción o unión de las bacterias a las superficies epiteliales (3).

Las cepas dispuestas a colonizar el tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística severamente afectados, son únicas en su capacidad de producir material capsular abundante, llamado recientemente glicocálix (polisacáridos localizados afuera de la porción oligosacárida de la pared celular lipopolisacárida) (3).

La colonización bacteriana del bronquio con fibrosis quística, interacciona con la superficie del tejido para alterar los mecanismos de defensa normales, como son la actividad mucociliar y la fagocitosis por macrófagos alveolares.

Otro factor que promueve la colonización de la mucosa en la fibrosis quística es el glicocálix de las células animales que puede ser un factor de predisposición para la atracción de las bacterias y estimula la producción de glicocálix de Ps. aeruginosa localizadas en regiones pulmonares (3).

El material capsular de Ps. aeruginosa además de la interacción con la superficie del huésped, inhibe también la fagocitosis,

por ejemplo, por macrófagos alveolares y confiere algún grado de protección contra inmunoglobulinas específicas. El glicocálix también produce interacción con las moléculas cargadas de agentes antimicrobianos, dando como consecuencia retardo en el paso y reducción en el número de moléculas que se introducen a la célula bacteriana (3).

Endotoxina.

La pared celular lipopolisacárida de Ps. aeruginosa es el componente endotóxico; sin embargo, posee una actividad biológica considerablemente más baja en los vertebrados que la endotoxina de las enterobacterias (3).

Enzimas Proteolíticas.

Una característica bien establecida de Ps. aeruginosa, es la producción de enzimas que degradan proteínas, entre estas proteasas se encuentran: (I) Elastasa: es una proteasa con actividad elastolítica, es activa contra la elastina, hemoglobina, varios factores del complemento y otras proteínas, algunos investigadores concluyen que la elastasa puede tener un papel central en el proceso de penetración de Ps. aeruginosa; (II) - Colagenasa: es una proteasa con actividad sobre el colágeno produciendo liberación de péptidos del mismo; (III) Fibrinolisisina; que puede actuar directamente sobre el fibrinógeno del huésped; (IV) Caseinasa: se ha relacionado con lesiones de piel necróticas; (V) Gelatinasa: tiene importancia en la diferenciación diagnóstica de Ps. aeruginosa de otras Pseudomonas;

(VI) Proteasa alcalina: produce dermonecrosis como función principal (3, 32).

La toxicidad de las proteasas es baja en comparación con otras toxinas bacterianas como la exotoxina A.

Además, sorpresivamente, Pseudomonas con una actividad de proteasas muy alta, tienden a ser menos virulentas que las cepas con menor actividad proteolítica, sugiriéndose que las cepas con elevada actividad proteolítica, están predispuestas para la degradación de sus propias toxinas proteicas (3, 32).

Las proteasas juegan un papel importante en la patogenicidad de Ps. aeruginosa en queratitis, neumonía e infecciones de quemaduras. Las proteasas dañan el tejido y pueden destruir barreras anatómicas y facilitar la diseminación de microorganismos de la puerta de entrada, las proteasas también son tóxicas a varios tejidos y capaces de degradar factores de coagulación y complemento (27).

La inmunización activa o pasiva contra estas proteasas puede ser benéfica para pacientes susceptibles (32).

Exotoxina A.

Su mecanismo de acción es igual al de la toxina diftérica, sin embargo, su composición es diferente.

Esta exotoxina produce inhibición de la actividad metabólica vital por paro de la síntesis proteica y es el producto más letal de Ps. aeruginosa. De acuerdo a esto, la exotoxina A es un factor patógeno importante en enfermedades causadas por Ps. aeruginosa; sus efectos, luego de la liberación in vivo, pueden

ser bloqueados por la inmunización pasiva con la antitoxina y -
posiblemente también por la inmunización activa con formas inac-
tivas biológicamente de la exotoxina A (3, 32).

Enterotoxina.

Ps. aeruginosa puede causar diarrea ya que se ha demos--
trado la producción de enterotoxina, sin embargo, la enfermedad
intestinal sólo se produce en raras ocasiones y el principio -
diarréico no ha sido aislado (3).

Hemolisina.

La producción de hemolisina se hace evidente a diario en
el trabajo de diagnóstico, por la actividad en las placas de -
agar sangre, causando generalmente hemólisis tipo beta (3).

Leucocidina.

Es un factor tóxico a las células blancas de la sangre -
(3).

Exoenzima S.

Es un factor de virulencia importante en la patogénesis
de infecciones en quemaduras (3).

La capacidad de estas bacterias para desarrollar resis--
tencia contra antibióticos en el curso de las enfermedades es -
alarmante, sin embargo, este, por sí, no es un factor de patoge-
nicidad (3).

Factores que favorecen la aparición de Pseudomonas aeruginosa - en enfermedades intrahospitalarias.

Uno de los factores importantes que favorecen su desarrollo es la presencia de huéspedes comprometidos en sus mecanismos de defensa, que poseen una elevada susceptibilidad a este tipo de enfermedades.

Durante las últimas tres décadas, ha habido un impresionante e inquietante incremento en la incidencia de enfermedades provocadas por Ps. aeruginosa, normalmente como enfermedades nosocomiales. La razón para este cambio dramático en la epidemiología de este microorganismo no se conoce completamente, pero el hecho de que estas enfermedades casi siempre ocurran en pacientes con defensas comprometidas, indica que un factor importante es el cambio que se sucede en el paciente y las modalidades terapéuticas de los hospitales modernos (11).

Así, el constante incremento en el uso de drogas citostáticas e inmunosupresoras, los procedimientos terapéuticos, los nuevos y continuos procedimientos quirúrgicos drásticos, etc. pueden facilitar en varias formas enfermedades serias por patógenos oportunistas como Ps. aeruginosa.

Si tomamos en cuenta que las defensas del huésped contra las enfermedades microbianas en general dependen de las primeras líneas de defensa representadas por las barreras epiteliales de la piel y membranas mucosas, así como de ciertos mecanismos de defensa sistémicos, sólo cuando se rompe la integridad de las defensas locales de primera línea y ocurre la penetración del microorganismo, se tendrán las condiciones para que ocurra la -

enfermedad clínica generalmente. La extensión de ésta depende de la eficiencia de los tres sistemas de defensa centrales: el sistema inmune, convencionalmente subdividido en sistema de las células B y el sistema de las células T; el sistema celular fagocítico, subdividido en células polimorfonucleares y el sistema de fagocitos mononucleares y, finalmente, el sistema del complemento, que puede ser activado ya sea por la vía clásica o por la vía alterna. Si además es claro que existe una extensa cooperación no sólo entre cada rama de estos tres sistemas, sino entre cada sistema mayor; es lógico pensar que en el paciente comprometido con enfermedad clínica, se encuentra como regla una combinación de defectos en las defensas a diferentes puntos, que predisponen a dicho paciente a desarrollar procesos infecciosos extensos y en muchos casos de alto riesgo (11).

De esta manera, los pacientes más susceptibles de presentar enfermedades por Pseudomonas son: infantes prematuros, niños con anomalías congénitas o fibrosis quística, pacientes con prótesis o cuerpos extraños en cavidades del cuerpo, pacientes con leucemia, pacientes que reciben usualmente terapia antibiótica, esteroides adrenales o antimetabolitos, pacientes con quemaduras y pacientes geriátricos con enfermedades neoplásicas y debilitantes (14).

Puede concluirse por lo tanto, que los defectos en las defensas del huésped que pueden predisponer a los pacientes a una enfermedad por Ps. aeruginosa parecen ser complicados y múltiples, afectando varios sitios en los mecanismos de defensa locales y sistémicos. Sin embargo, el estado funcional de las defensas to

tales del huésped no sólo es importante en el desarrollo clínico de la enfermedad, sino también para la prevención y el tratamiento de las enfermedades (11).

Así, la vacunación, terapia de inmunización pasiva, infusiones de granulocitos e inmunopotenciación farmacológica, son sólo unas pocas posibilidades, además de las mejoras potenciales en los antibióticos antipseudomonas que están a nuestra disposición. Sin embargo, los mejores antibióticos probablemente nunca podrán resolver los problemas que causa Pseudomonas en la medicina moderna (11).

Otro factor importante en la gran incidencia de enfermedades nosocomiales causadas por Pseudomonas es el uso constante de aparatos de terapia, como son: catéteres, diálisis, dispositivos intravenosos, aparatos de apoyo ventilatorio, tubos endotraqueales, que a menudo acarrean microorganismos y son la causa del desarrollo de infecciones de varios tipos (15, 31).

Si recordamos que los pacientes con infecciones causadas por Pseudomonas a menudo están grandemente comprometidos y son incapaces de eliminar eficientemente la bacteria invasora por mecanismos inmunes normales, aunado a la virulencia de Ps. aeruginosa, se comprende y explica la mortalidad tan alta en las infecciones sistémicas (24).

Sin embargo, la elección de antibióticos para el tratamiento de estas enfermedades es complicada por el hecho de que las especies de Pseudomonas son resistentes a los antibióticos más comúnmente usados, y más aún, muchas de las cepas nosocomiales son resistentes a un gran número de drogas antipseudomonas, ha-

ciendo difícil el tratamiento de estas enfermedades y, por lo mismo, favoreciéndose la diseminación del microorganismo en el ambiente hospitalario (24).

La amplia distribución de los microorganismos resistentes en los hospitales es favorecida por varios factores: 1) En ocasiones los microorganismos agresores no sólo son patógenos, sino también forman parte de la flora normal del individuo. 2) La supresión de los microorganismos sensibles en pacientes tratados, crea probablemente un nicho ecológico que ocupan los microorganismos resistentes. 3) Las bacterias patógenas pueden ser suficientemente viables para transferirse con facilidad de un individuo a otro. 4) Esta transmisión se facilita en muchos hospitales por la relajación de las medidas de asepsia en la práctica médica y de saneamiento del ambiente (9).

El empleo de los quimioterápicos puede conducir no sólo a la aparición de mutantes resistentes de modo individual en los pacientes, sino también a la difusión de las cepas resistentes, como respuesta al cambio ecológico producido por el tratamiento. Estas cepas son a menudo tan virulentas como sus antecesores sensibles y así pueden persistir entre la población. Este problema es mundial y es el resultado del empleo frecuente e indiscriminado de medicamentos antimicrobianos en el hombre : incluso en los animales. Es preciso entonces, proceder a una administración más racional y coordinada de los antibióticos y aplicar medidas estrictas contra su uso indebido, con el fin de reducir la gravedad del problema (9, 25).

Epidemiología hospitalaria.

Definición de enfermedad hospitalaria o nosocomial.- Una enfermedad nosocomial se define como una enfermedad clínicamente evidente o probada bacteriológicamente en un paciente hospitalizado, el principio de la cuál ocurrió al menos durante un período de incubación después de la admisión del paciente o cuando el período de incubación no se conoció, al menos 48 hrs. después de la admisión del paciente (10).

La necesidad de prevenir la posible adquisición de una enfermedad en un hospital, constituye una reconocida responsabilidad de la propia institución y de su dirección, por lo que la importancia y la frecuencia con la que ocurren dichas enfermedades debe enfatizarse entre el personal y administradores con el fin de acentuar la necesidad de realización de prácticas higiénicas, tanto ambientales como en el personal y para la observación estricta de los principios de asepsia, a menudo descuidados; por lo mismo, es recomendable la organización de una comisión para control de enfermedades, así como otros requisitos para el establecimiento de la política y metodología del hospital (10, - 30).

Existe entonces una necesidad crítica relacionada con la aplicación de técnicas elaboradas: 1) para reducir la población microbiológica del medio ambiente del hospital; 2) para eliminar el peligro de la transmisión de los microorganismos de un individuo a otro, ya sea del personal del hospital al paciente y viceversa, o bien de paciente a paciente, y 3) para manejar la ropa de cama, el equipo y demás fomites, de manera que puedan elimi-

narse como fuente de contaminación cruzada. De hecho, la naturaleza de la población de los hospitales, así como la introducción de nuevos métodos, tales como transplantes de órganos y regímenes de tratamiento que neutralizan las defensas corporales, indican que la total aplicación de las técnicas de control de enfermedades en hospitales todavía revestirá mayor importancia en lo futuro (30).

Población hospitalaria.

La población hospitalaria constituye un elevado porcentaje de enfermos que tienen una sensibilidad aumentada a las enfermedades. Dicha susceptibilidad existe en el recién nacido, en el quemado, en el enfermo senil debilitado y en quienes padecen ciertas enfermedades metabólicas, en los que están siendo tratados con esteroides o han sufrido extensas operaciones quirúrgicas. Estos enfermos, proporcionan a varios tipos de microorganismos la oportunidad de causar una enfermedad, como es el caso de Ps. aeruginosa (30).

Muchas de las bacterias asociadas con una enfermedad adquirida en un hospital son miembros de la flora bacteriana habitual del hombre, por lo que hay que recalcar, que dichos microorganismos están constantemente presentes en la atmósfera hospitalaria.

Son portados por pacientes, visitantes y personal del hospital; además, numerosas bacterias que no se consideran normalmente pertenecientes a la flora normal, son portadas por algunas personas; por lo tanto, el personal del hospital que consta de médicos, enfermeras, técnicos, etc. aunque represente presumible-

mente una población normal y sana, es portadora en todo momento de una flora normal de agentes microbianos, proporcionando entonces un reservorio potencial constante.

En el cuidado de los enfermos existe un contacto íntimo entre el personal y el enfermo, que no se da en otros ambientes, al menos en la misma medida. Así, es muy real la potencialidad de una transmisión directa de microorganismos del personal a los enfermos y viceversa, así como de enfermo a enfermo (25).

Es muy difícil valorar en los enfermos su poder de autoinfección, pero en general se está de acuerdo en que la infección individual desempeña un papel importante en el sujeto hospitalizado. Cada paciente tiene un componente normal de bacterias en la superficie del cuerpo, en el tubo gastrointestinal y en las regiones respiratorias altas, que no pueden reducirse de modo suficiente, incluso con los mejores métodos de preparación de la piel, para prevenir la infección de la incisión quirúrgica en determinados pacientes, pudiendo dar lugar a una bacteremia temporal como resultado de un traumatismo o bien del depósito de bacterias alrededor de incisiones operativas (30).

Existen otros caminos por los que puede penetrar la autoinfección, como la extirpación de un apéndice o de una vesícula biliar infectados o la resección del intestino (30).

Según lo antes mencionado es necesario establecer una serie de medidas preventivas que ayuden a reducir en lo más posible las enfermedades nosocomiales transmitidas por estos medios, y dichas medidas pueden comprender a las siguientes: 1) desinfección de las manos, ya que la remoción de microorganismos de la

de la flora residente (llamada desinfección quirúrgica de manos) es importante en la desinfección preoperativa de las manos de cirujanos, mientras que la desinfección para remover microorganismos de la flora de transición (desinfección higiénica de las manos) se requiere para desinfectar las manos de enfermeras y doctores para prevenir la transferencia de bacterias de un paciente a otro; 2) desinfección de los sitios de operación, cuya efectividad dependerá no sólo del agente usado, sino también de la forma de aplicación de éste (19).

Medio hospitalario.

El ambiente físico de un hospital es un complejo de áreas y equipos, algunos de los cuales han sido denominado críticos. En todas partes, este medio ambiente tiende a ser cada vez más complejo con la incorporación de nuevos equipos y nuevos medios; así, cada vez hay más hospitales que instalan aparatos de aire acondicionado y de control de aire, esto supone una gran ventaja para la institución, enfermos y personal, pero requiere un planeamiento cuidadoso y un mantenimiento, porque si no, podría crear un riesgo auténtico de enfermedad de cualquier tipo. Es necesaria también una consideración detenida de cosas tales como la colocación de vertederos de basura y de ropa blanca sucia, así como de su diseño y mantenimiento (30).

El contenido microbiano del medio ambiente hospitalario depende en gran medida de la gente y su actividad. La mayor parte de los microorganismos son los que normalmente portan los enfermos, el personal y los visitantes, ello determina la calidad de la flo-

ra microbiana en cualquier momento dado, la cantidad depende de un conjunto de factores que incluyen el tipo de control de aire, el tipo de actividad del personal, la naturaleza de la zona y, sobre todo la conciencia del personal y su actuación frente a los riesgos que involucran el desarrollo de infecciones hospitalarias (30).

Modos de transmisión.

Ha habido mucha discusión acerca de los mecanismos por los que los enfermos se infectan en el hospital y la relativa importancia de las diversas vías posibles, éstas se clasifican como: transmisión por aire, por contacto directo y por contacto indirecto.

Es importante hacer notar que los microorganismos necesitan un medio de transporte que los lleve de un sitio a otro, además, debe existir un número suficiente de microorganismos presentes para que este mecanismo actúe. Este último es un factor decisivo y tiene una aplicación fundamental en los programas de control de la infección. La importancia relativa de cualquier vía de transmisión depende de la situación existente (30).

Es fácil concebir la posibilidad de que un hospital, con un personal inadecuado y un control de la atmósfera deficiente, podría encontrarse con tal cantidad de bacterias atmosféricas, que dicha vía podría ser responsable de un número considerable de infecciones. Por otra parte, un hospital rigurosamente limpio, pero en el que el personal falle en observar las técnicas asépticas necesarias y no tenga cuidado en el manejo de los pa-

cientes, podría descubrir que el contagio directo tiene una gran importancia. Negligencia en la esterilización adecuada del instrumental, una escasa técnica en el tratamiento de la ropa blanca y el uso inadecuado del material, por ejemplo, el descuido en el empleo de un juego diferente de instrumental para cada enfermo, haría pensar en la importancia de la transmisión indirecta. Otro aspecto importante, es la predisposición del paciente a adquirir una infección, por consiguiente, se deben considerar todas las vías de transmisión de las infecciones para proyectar los programas de control (30).

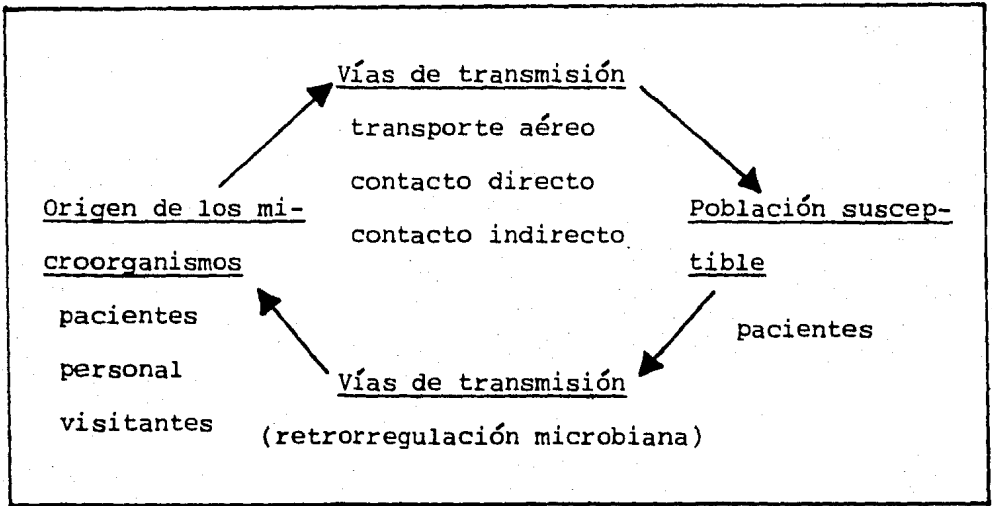


Fig. 1 Epidemiología de la infección adquirida en el hospital (30).

Control de las enfermedades nosocomiales.

Para llevar a cabo un programa de control de enfermedades en un hospital, es necesario realizar la elección de un comité de control que tendrá funciones relacionadas con el programa

ma que se lleve a cabo.

Programa de control de enfermedades.

El programa de control presenta algunas dificultades en su realización, debido a su complejidad, ya que se debe tener primeramente, el establecimiento de un sistema de vigilancia eficaz; segundo, la educación del personal respecto a su responsabilidad y función dentro de sus actividades cotidianas, y tercero, la provisión de lineamientos para la prevención de la transmisión de enfermedades dentro del hospital. Este último aspecto puede subdividirse en tres partes: control ambiental (transmisión aérea), personal (contagio directo) y el tratamiento del instrumental, ropa blanca, equipo, etc., que puede considerarse como causa del contagio indirecto (30).

Vigilancia.- El establecimiento de un sistema de vigilancia adecuado constituye la piedra angular sobre la que debe construirse cualquier programa de control de enfermedades.

Los objetivos de los programas de vigilancia de enfermedades nosocomiales son: 1) la colección de datos de los patrones de enfermedad dentro de un hospital y la identificación de las formas más comunes de las mismas, así como las áreas del hospital, procedimientos y grupos de pacientes asociados con alto riesgo, para la adquisición de enfermedades hospitalarias; 2) la detección temprana de cambios en estos patrones; 3) la detección temprana de brotes de enfermedades intrahospitalarias, 4) el control rutinario de patrones de sensibilidad a agentes antimicrobianos de la flora bacteriana causante de estas enfermedades; y

5) que la presencia y actividad de los comités de vigilancia en las diferentes secciones de un hospital se asocie con una mayor conciencia entre el personal de estos pabellones, acerca del problema de enfermedades nosocomiales y quizás, un cambio en actitudes y prácticas deseables (10).

Se ha determinado que existen elementos esenciales para cualquier programa de vigilancia para enfermedades nosocomiales, tanto para hospitales privados, como para organizaciones gubernamentales. En estos sistemas de vigilancia, el personal que lleva a cabo el control debe: 1) seleccionar una muestra representativa de tamaño adecuado de pacientes hospitalizados, que proporcione estimaciones precisas y sin desviaciones de la incidencia de enfermedades nosocomiales; 2) coleccionar datos adecuados para determinar rangos y para identificar los factores de riesgo modificables y no modificables; 3) emplear un sistema de clasificación de las enfermedades hospitalarias para propósitos clínicos y epidemiológicos; 4) usar un sistema de reporte apropiado y estandarizado y, 5) garantizar que los programas de prevención estarán ligados en gran medida al sistema de vigilancia (31).

Los programas de vigilancia entonces, son importantes para determinar las áreas de mayor prioridad y presentar una idea balanceada de los patrones, tendencia y dirección del problema de la enfermedad nosocomial. Así, esta vigilancia debe ser extendida a tantas unidades de un hospital como sea posible y llegue a ser una actividad de rutina del hospital, sirviendo como base para la prevención de enfermedades, como herramienta de evalua-

ción de acciones preventivas y como componente en el control de calidad del cuidado proporcionado a un hospital (10).

Educación.- La responsabilidad en la educación, del comité de control de enfermedades, es una parte esencial de un programa bien organizado. No requiere ser un programa formal de conferencias, sino más bien debe consistir en establecer una conciencia de la necesidad de prevenir la enfermedad hospitalaria (30). El comité de infecciones a través de su mecanismo de comunicación, puede y debe mantener un flujo de información constante que circule en las diversas zonas del hospital, constituyendo otra faceta de la función educativa del comité de vigilancia dentro del hospital (30).

Control del ambiente y vigilancia.- Existe evidencia que indica que la transmisión aérea puede ser un factor importante en las enfermedades adquiridas en un hospital y se ha desarrollado el concepto de que los hospitales tienen tendencia a formar una "flora hospitalaria" compuesta por microorganismos autóctonos del propio hospital (30).

Además, existe la idea de que el hospital puede constituir un centro potencial de diseminación de microorganismos hacia la comunidad circundante. Se han realizado estudios microbiológicos extensos en el medio ambiente hospitalario contrastando hospitales viejos sin sistemas de aire acondicionado y modernos con sistemas de aire acondicionado. En ninguno de los casos se pudieron hallar pruebas indicativas de la existencia de una flora hospitalaria, los resultados de los estudios indicaron que los

niveles de bacterias en el aire están íntimamente relacionados con el cuidado del centro hospitalario; por lo tanto, la muestra del aire proporciona un medio excelente de control de calidad en esta importante actividad.

Los factores determinantes del contenido de bacterias en el aire del hospital son: la limpieza general, las personas y sus actividades, la arquitectura y el sistema de control de aire -

(30).

Se ha realizado un gran esfuerzo para eliminar los reservorios de patógenos potenciales, así como cerrar las rutas por las que el agente infeccioso se pone en contacto con sus víctimas. Ya que el ambiente hospitalario tanto animado como inanimado puede servir como reservorio y vehículo para la infección, la mayor parte de los esfuerzos se han enfocado en él. Sin embargo, al ser probados programas que intentan destruir o al menos reducir el número de microorganismos en el hospital, produjeron poca efectividad evidente en el control de las enfermedades nosocomiales, por lo que la vigilancia ambiental no puede usarse como un factor de medición de riesgo, ya que no se ha encontrado ninguna prueba de relación entre los niveles de bacterias en el aire y la incidencia de enfermedades adquiridas en el hospital, - sin embargo, el cultivo microbiológico puede emplearse como parámetro para la vigilancia del medio ambiente (21, 30).

Los cultivos bacteriológicos de las superficies, si se emplean adecuadamente, pueden proporcionar un medio de evaluación de la eficacia de las técnicas de limpieza.

A pesar de que la relación entre la contaminación de la superfi

cie y la del aire no se entiende completamente, existe una amplia evidencia que muestra que la limpieza general, una gran parte de la cual es la limpieza de las superficies, tiene un efecto directo sobre el contenido aéreo de bacterias.

Por lo tanto, la vigilancia del ambiente tiene por lo menos dos facetas; la toma de muestras de bacterias del aire y los cultivos de superficie, que pueden contribuir al mantenimiento eficaz de una atmósfera hospitalaria adecuada, cuando se usan correctamente (30).

Fomites.- Como se ha mencionado con anterioridad, los fomites constituyen un mecanismo potencial de transmisión de microorganismos; por lo que, a este respecto deben tomarse en cuenta, con gran interés, los diversos problemas de esterilización y de sinfección de instrumentos.

La esterilización. que generalmente se lleva a cabo mediante calor seco o húmedo, con el gas óxido de etileno y en ocasiones con beta-propiolactona, debe realizarse por personal plenamente familiarizado con los requerimientos de las técnicas de esterilización, para obtener buenos resultados (30).

La desinfección y el buen uso de los desinfectantes químicos que incluyen la gama de los fenoles, las sales cuaternarias de amonio, los derivados del yodo, hidrocarburos de cadena larga, etc., debe practicarse como método de rutina en el uso de instrumental dentro de un hospital.

Debe tomarse en cuenta que la desinfección implica que el objeto que va a ser desinfectado será incapaz de transmitir la infección, sin confundir con la esterilización que implica la des

trucción de todos los agentes vivos (30).

El lavado, tratamiento, transporte y evacuación de la ropa blanca, debe vigilarse correctamente, investigándose inmediatamente cualquier evidencia de evacuación inadecuada de ésta, si existe contaminación bacteriana (30).

Personal.- No debe permitirse que esté de servicio nadie que tenga una enfermedad manifiesta, teniendo especial importancia los portadores de lesiones infectadas de naturaleza superficial, sobre todo en las manos u otras zonas expuestas.

La investigación epidemiológica de los brotes de infección ha indicado que las personas que sufren una enfermedad activa, son por lo general, más peligrosas que el portador, ya que existe la probabilidad de que el número de microorganismos en el individuo enfermo sea mucho mayor que en el portador, así, con el descubrimiento de cierto tipo de portadores y de casos activos, que pueden retirarse del ambiente, se reducirá en gran medida el peligro de la infección nosocomial (30).

Mantenimiento del equipo.- Existen ciertos componentes del equipo que precisan de una atención especial. Los reservorios de agua de todo tipo como los humidificadores, o los de un equipo de oxígeno, tienen tendencia a contaminarse, sobre todo con Pseudomonas y, ya que estos microorganismos son resistentes a los desinfectantes, el método de elección para el mantenimiento de dichos reservorios es una limpieza frecuente (30).

El equipo para la terapéutica de inhalación, que se utiliza en pacientes que pueden ser particularmente susceptibles a desarro

llar enfermedades de las vías respiratorias, tiende a quedar - muy contaminado con el uso, por lo que entre paciente y paciente, es preciso desmontarlo completamente para limpiarlo y desinfectarlo. Puesto que una gran parte de este equipo no puede ser esterilizado con calor, es necesario utilizar un desinfectante adecuado o esterilización con gas. Un punto crítico en el uso - de desinfectantes es el enjuague usado para eliminar el desinfectante; esta solución debe cambiarse con frecuencia, o de - otro modo queda frecuentemente contaminada, por lo que vuelve a contaminar el equipo (30).

Los equipos empleados para administrar infusiones intravenosas pueden quedar contaminados como resultado de un uso prolongado o debido a un montaje inadecuado. El flujo constante de material que contiene bacterias, origina el desarrollo de fiebre en el paciente hasta que se interrumpe la infusión y, tal introducción de bacterias, puede dar lugar a complicaciones en pacientes debilitados (30).

Todo instrumental tiene tendencia a recoger polvo, que puede liberarse cuando se coloca directamente a un paciente o bien cerca de él, por lo que es esencial la atención constante en mantener limpio este equipo. El equipo de fisioterapia incluye las piscinas de inmersión que deben ser drenadas, limpiadas y vueltas a llenar entre paciente y paciente, ya que el agua caliente empleada habitualmente, permite la supervivencia de la mayor parte de los microorganismos.

Se debe poner mucho cuidado también en comprobar que los aparatos como filtros de aire, ventiladores y conducciones de aire -

estén limpios y en orden, por lo que son esenciales en estos sitios los programas de mantenimiento habitual (30).

En resumen, un programa ideal de control de enfermedades en un hospital moderno, requiere cierto grado de aislamiento de cada paciente, que se lleva a cabo mediante la combinación del control del ambiente, el empleo de las mejores técnicas de asepsia, el mantenimiento de una higiene personal adecuada y el control cuidadoso de ciertos objetos como el instrumental, equipo, etc. (30).

1.2 ANTIBIOTICOS Y AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS.

Las drogas que son usadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas pueden ser antibióticos y agentes quimioterapéuticos. Los antibióticos, sustancias antiinfectivas de origen natural, son productos secundarios del metabolismo de hongos, bacterias, actinomicetos y micromonospora, mientras que los agentes quimioterapéuticos son drogas antimicrobianas sintéticas (4).

El agente antimicrobiano ideal debe mostrar toxicidad selectiva, es decir, debe interferir algún proceso metabólico o sintético que exista en el agente infeccioso únicamente y no en las células del huésped, y debe poder administrarse a concentraciones toleradas por éste. No obstante, el concepto de una verdadera toxicidad selectiva existe en un sólo grupo de antimicrobianos, las penicilinas, que sólo actúan contra el microorganismo, todos los demás agentes antimicrobianos interfieren en reacciones que se llevan a cabo tanto en los microorganismos como en las -

células huésped; sin embargo, estos antimicrobianos actúan y son efectivos contra el agente infeccioso, antes que con las células huésped, debido a que la velocidad de las reacciones metabólicas en el microorganismo son más rápidas que en las células de los tejidos. De este modo, las drogas inhiben la replicación de los microorganismos, para que los mecanismos de defensa del huésped puedan eliminar a los agentes invasivos (14).

Los agentes antimicrobianos para poder manifestar su acción inhibidora del crecimiento, lo primero que requieren es tener acceso a' sitio receptor, para después llevar a cabo su actividad que puede ser bactericida o bacteriostática (14).

Las drogas bactericidas destruyen a los microorganismos y son más efectivas durante la fase logarítmica de crecimiento, dado que el incremento de la actividad metabólica proporciona una susceptibilidad máxima. Los agentes bacteriostáticos, sólo previenen el crecimiento bacteriano durante un período más o menos corto. Esta clasificación tiene uso clínico, pero la acción de estos dos grupos de agentes es dependiente de la dosis in vivo; así, las drogas bactericidas, exhiben comúnmente un efecto bacteriostático en concentraciones subóptimas, y los agentes bacteriostáticos pueden ser bactericidas a altas concentraciones de la droga (4).

A nivel celular y subcelular, los agentes antimicrobianos pueden actuar en una de estas cuatro maneras:

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- 2) Alteración de la permeabilidad de la membrana.
- 3) Inhibición de la síntesis protéica.

4) Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales (12).

Agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared celular.

Dentro de este grupo de antimicrobianos se encuentran el grupo de las penicilinas y el grupo de las cefalosporinas. Se sabe que la forma e integridad de la célula bacteriana, está mantenida por la pared celular que rodea y protege a la membrana citoplásmica. La biosíntesis incompleta de la pared, da una forma frágil, que en el ambiente hipotónico usual causa la hinchazón de la membrana y la posterior lisis de la célula (14). La síntesis de la pared celular ocurre por construcción del mucopéptido-nucleótido unido al lípido en la membrana celular. La acción primaria de los agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, es precisamente evitando la síntesis del peptidoglicano, actuando a varios niveles de la misma. Todos estos agentes son bactericidas para las células sensibles y actúan solamente durante el crecimiento y la replicación de la bacteria, cuando las reacciones biosintéticas para la formación de la pared celular están ocurriendo a una velocidad máxima.

A diferencia de las células del huésped, las bacterias no están en medios isotónicos en los fluidos biológicos, sino que su contenido está bajo una presión osmótica alta y su viabilidad depende de la integridad de la red de mucopéptido en la pared celular, que debe mantenerse durante el ciclo de crecimiento. De este modo, cualquier compuesto que inhiba algún paso en la bio-

síntesis de la macromolécula del mucopéptido, causa que la pared de la célula bacteriana se debilite y la célula, por último, sufra la lisis (14).

Grupo de las penicilinas.

Estructura química: La estructura básica de todas las penicilinas es un anillo tiazolidina, fusionado con un anillo beta-lactámico (que forman la estructura del ácido-7-amino penicilánico), del cual depende la actividad antibacteriana y una cadena lateral que determina las características de cada penicilina individualmente, además de poseer un sitio formador de la sal (4).

Modo de acción: Las penicilinas inhiben la última etapa de síntesis de la pared celular, donde se establecen los enlaces transversales entre las cadenas paralelas del peptidoglicano, gracias a una reacción de transpeptidación. A pesar de que este mecanismo por sí no es letal, permite el crecimiento de microorganismos con pared defectuosa que se rompe bajo la fuerza de su propia presión osmótica (12).

Grupo de las cefalosporinas.

Estructura química: El bloque de construcción de las cefalosporinas, es el ácido-7-amino cefalosporánico, compuesto de un anillo beta-lactámico (esencial para la actividad antibacteriana), fusionado con un anillo dehidrotiazina, en lugar del anillo tiazolidina de las penicilinas (4).

Modo de acción: Las cefalosporinas, debido a su gran semejanza

en estructura química a las penicilinas, actúan de la misma manera que éstas, inhibiendo la última fase de la síntesis de la pared celular (4, 12).

Agentes antimicrobianos que afectan la permeabilidad de la membrana celular.

En este grupo de la clasificación se encuentran las polimixinas.

La membrana citoplásmica bacteriana es el sitio de la célula en donde se sintetiza la pared celular de muchos microorganismos. Además, sirve como barrera osmótica y como un órgano para el transporte intracelular selectivo y de concentración, de los nutrientes celulares esenciales. Contiene una variedad de enzimas necesarias para el metabolismo intermediario, para la formación de la pared celular, así como componentes responsables del transporte de aminoácidos y azúcares en la célula (4, 14).

Los antibióticos "activos de superficie" como son las polimixinas, dañan las membranas celulares bacterianas por incremento de la permeabilidad.

Grupo de las polimixinas.

Estructura química: Estos antibióticos pertenecen al grupo de los péptidos, formados de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos que incluyen comúnmente formas D y L de aminoácidos.

En las polimixinas, los aminoácidos se unen en la forma de un anillo con un ácido graso característico en el extremo terminal. Es importante hacer notar que la colimicina o colistina descu**h**ber's, posee una estructura idéntica a la polimixina E (12).

Modo de acción: Este grupo de antibióticos actúa deteriorando - las membranas celulares bacterianas por incremento de la permeabilidad; así, los microorganismos sensibles forman un complejo, uniendo la droga con los componentes fosfolipídicos de la membrana celular y éstos, gracias a sus grupos lipofílicos y lipofóbicos, se orientan entre los lípidos y proteínas de la membrana, alterando sus funciones, destruyendo las propiedades osmóticas de dichas membranas bacterianas, dando por resultado el escape de macromoléculas y la muerte de las células (4, 22).

Agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis protéica y la traducción de la información genética.

En esta clasificación podemos agrupar, entre otros, a los aminoglucósidos, lincomicinas, macrólidos y rifamicinas. La biosíntesis de proteínas es una secuencia compleja de eventos, que pueden dividirse en dos grandes pasos:

1) Precursor.- La replicación de la información genética para la biosíntesis de ADN y ARN se lleva a cabo en esta etapa; y
2) Síntesis.- Se realiza la traducción de la información, por medio de la cual, dicha información codificada en el ARN mensajero, se convierte en una proteína. Este paso de síntesis puede subdividirse en tres etapas:

a) Etapa de iniciación, donde un ribosoma 30 S se combina con un ARN_m y ARN_t para formar un complejo inicial que se combina con una subunidad 50 S de ribosoma, para formar el ribosoma 70 S, el sitio de la síntesis protéica; b) Etapa de elongación, cuando los aminoácidos activados codificados en el ARN_m se adi-

cionan a la cadena peptídica creciente; y c) Etapa de terminación, donde se alcanza un codón terminador y la proteína completa se separa del ribosoma. En esta etapa, las subunidades 50 y 30 S se disocian y reunen un caudal de subunidades libres antes de recombinarse con un nuevo mensajero para repetir el ciclo (14).

Los antibióticos que inhiben la traducción o bien la síntesis de una proteína, inhiben dicha síntesis protéica por sí, en la etapa de iniciación y elongación, o inducen a la formación de moléculas protéicas defectuosas; estos antibióticos que producen proteínas defectuosas son bactericidas en su acción, ya que la célula microbiana no puede funcionar con una proteína defectuosa. Los antimicrobianos que inhiben pasos específicos de la síntesis proteica son bacteriostáticos (14).

Grupo de los aminoglucósidos.

Estructura química: Un gran número de antibióticos que esencialmente son carbohidratos, se conocen como aminoglucósidos, ya que generalmente contienen varios grupos amino en sus estructuras glucosídicas (10).

Modo de acción: El efecto letal de los aminoglucósidos es resultado de la unión irreversible de las drogas a los ribosomas y la interferencia subsecuente con algunas fases de la síntesis de proteínas; iniciación, elongación o terminación de la cadena (23).

Así, estos antimicrobianos actúan sobre el ribosoma bacteriano, induciendo ciertos errores específicos en la lectura del código

genético, también pueden impedir la elongación de la cadena peptídica, o después de su unión al ribosoma, interrumpen el ciclo normal del mismo, conduciendo a la incorporación de uno o más aminoácidos incorrectos en una cadena peptídica en crecimiento, produciéndose así una proteína defectuosa; de igual manera funcionan interfiriendo la fase de terminación de la síntesis proteica (14).

Grupo de las lincomicinas.

Estructura química: La lincomicina muestra una estructura química única entre los antibióticos conocidos. Se han preparado un gran número de derivados de la lincomicina, la mayoría de los cuales son menos activos que el compuesto inicial, con la excepción de la clindamicina que muestra mayor actividad (12, 14).

Modo de acción: Actúan por inhibición de la síntesis de proteínas, por unión a las subunidades ribosomales 50 S, que previene la síntesis del polipéptido en los complejos ribosomales que lo contienen. Además, inhiben la actividad de la peptidil transferasa, que es la enzima que cataliza la formación de las uniones peptídicas durante la etapa de elongación y manifiesta también su acción sobre el mecanismo de remoción de la proteína en el proceso de terminación de la misma. La unión de la lincomicina a la subunidad 50 S del ribosoma, impide la unión al ribosoma del complejo ARN_t -aminoácido activado (4, 12, 14).

Grupo de los macrólidos.

Estructura química: Están formados por un anillo lactona macro-

cíclico al cual se unen azúcares (12).

Modo de acción: Funciona inhibiendo la síntesis protéica a nivel de la traducción, por combinación de la droga con la unidad ribosomal 50 S, interfiriendo así el sitio ribosomal donde los aminoácidos son transportados para la formación de la proteína. S afecta principalmente la síntesis de proteínas grandes y, la formación de nuevas proteínas, se bloquea al final del crecimiento de la cadena peptídica (14).

Grupo de las rifamicinas.

Estructura química: Las rifamicinas son un grupo de antibióticos macrocíclicos complejos, en donde el anillo macrocíclico es el responsable de su acción (12).

Modo de acción: Inhiben la ARN polimerasa dependiente de ADN, por formación de un complejo muy estable entre el anillo macrocíclico y la enzima, bloqueando de esta manera la cadena de iniciación de ARN, es decir, la iniciación de la síntesis de ARN. Estos antibióticos inhiben la ARN polimerasa selectivamente (4, 12, 14).

Agentes antimicrobianos miscelaneos.

Nitrofuranos.

Estructura química: Son agentes quimioterapéuticos derivados del 5-nitro-2-furaldehído. La presencia del grupo nitro en la posición 5 del anillo furano, es esencial para su actividad antibacteriana (4).

Modo de acción: Se ha visto que actúa probablemente, deprimien-

do la formación de acetyl CoA; la furazolidona inhibe la actividad de la enzima monoaminooxidasa (12).

Fosfomicina.

Estructura química: Es un antibiótico bactericida de amplio espectro, de estructura química simple, derivado del ácido fosfónico, este antimicrobiano no pertenece a ninguna familia de antibióticos.

Modo de acción: Su actuación es muy similar a la de la penicilina, inhibiendo el primer paso en la síntesis del peptidoglicano en el proceso de biosíntesis de la pared celular de las bacterias (26).

Penicilinas	{ Ampicilina Carbenicilina Dicloxacilina Penicilina G
Cefalosporinas	{ Cefalotina
Polimixinas	{ Colimicina
Aminoglucósidos	{ Amikacina Dibekacina Gentamicina Kanamicina Sisomicina Tobramicina

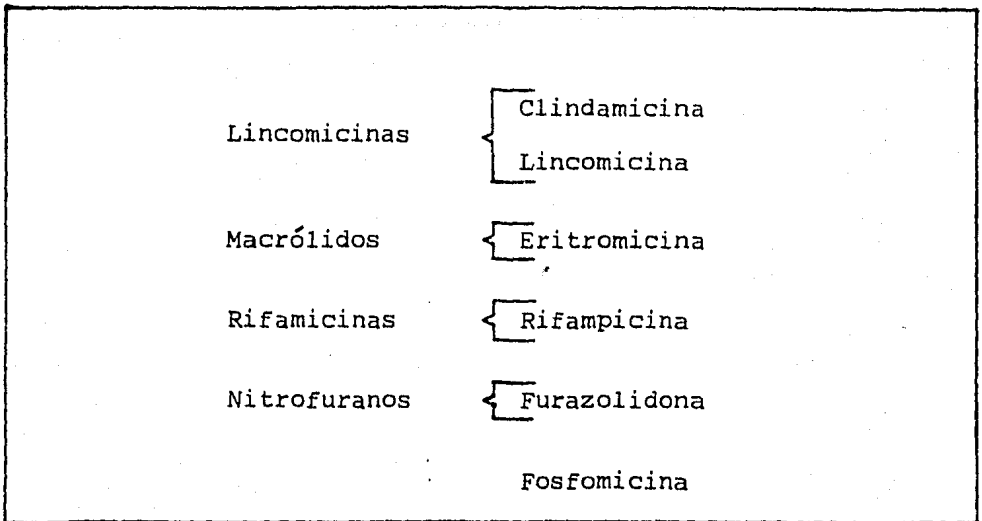


Fig. 2 Distribución de los antibióticos empleados en este trabajo, de acuerdo a los grupos de antibióticos a los que pertenecen.

1.3 PROBLEMA DE LA APARICION DE CEPAS RESISTENTES DE Pseudomonas aeruginosa A LOS ANTIMICROBIANOS.

Resistencia bacteriana.

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos, constituye un grave problema en los medios hospitalarios, no sólo desde el punto de vista teórico, sino sobre todo, en el aspecto práctico, ya que este problema, tan importante en la Bacteriología Clínica, debe llegar a comprenderse perfectamente para después intentar una solución. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que muchas veces el fallo de un tratamiento antimicrobiano, no se debe a la farmacoresistencia, sino a otras causas como las siguientes: la acción de un antibiótico en ocasiones pue

de ser neutralizada por la administración de otro medicamento - (se sabe que los antibióticos de acción bacteriostática pueden antagonizar la acción de quimioterápicos bactericidas), puede también depender el fracaso, de un trastorno en la absorción - del antibiótico; así mismo, la iniciación del tratamiento puede ser demasiado tardía o bien la quimioterapia no ser la adecuada (8).

Debe tenerse presente además, que el microorganismo puede encontrarse en el organismo en forma de una variante morfológica, como es el caso de las formas L, que al carecer de paredes celulares, son insensibles a antibióticos que actúen sobre estas estructuras (8).

Por último, el fracaso terapéutico puede depender de condiciones histopatológicas que impiden el contacto del antibiótico - con la bacteria. Con objeto de separar todos estos problemas - que pueden conducir a una quimioterapia ineficiente, se requiere que el diagnóstico sea oportuno, que se tenga presente el conocimiento de las principales características de los diversos - antimicrobianos, así como las normas terapéuticas para realizar el empleo adecuado de los quimioterápicos. Sin embargo, aún se puede presentar el fracaso a causa de la resistencia bacteriana, que alcanza niveles inquietantes sobre todo en ambientes hospitalarios y que justifica de esta manera la búsqueda constante - de nuevos fármacos antibióticos (8).

Problemas actuales de la antibioterapia en medios hospitalarios.

Hoy en día, para juzgar el valor de un antibiótico no -

puede prescindirse de algunas consideraciones relativas a los - problemas terapéuticos actuales, ligados al fenómeno de la resistencia bacteriana que cada vez es más frecuente.

Sin duda, 30 años de terapia antibiótica han producido profundas modificaciones en la microflora patógena, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde el uso continuo de fármacos antibacterianos ha favorecido la selección de las cepas menos sensibles o de las cepas portadoras de resistencia contra uno o más antibióticos. Ahora podemos precisar la localización de los genes responsables de la resistencia y cómo puede transferirse ésta de célula a célula (6).

La aparición y selección de cepas resistentes al uso rutinario de los quimioterápicos y el descubrimiento de los factores responsables de la resistencia múltiple, son elementos que explican que en el campo clínico epidemiológico, las infecciones por bacterias como Pseudomonas, sean de aparición temible y cada vez más frecuente. Estos problemas obligan a adoptar, sobre todo en medios hospitalarios, una línea de conducta en relación con el empleo de antibióticoterapia que no puede omitir un profundo conocimiento sobre el desarrollo de la resistencia bacteriana y su transmisión (8).

Farmacorresistencia.

Se sabe en la actualidad que la resistencia bacteriana es un fenómeno de mutación, se trata de un hecho espontáneo y natural presente en toda colonia bacteriana, independientemente de los fenómenos adaptativos contra un fármaco determinado (8).

La resistencia natural, la resistencia por transformación, la resistencia por selección de mutantes, la resistencia cruzada, la resistencia múltiple, dependen todas de determinantes genéticos presentes en las nucleoproteínas cromosómicas y extracromosómicas, que pueden ser transmitidas por medio de los procesos normales de duplicación, o transferidas mediante los fenómenos de transducción (fagos) o de conjugación de célula a célula, aún cuando pertenezcan a especies bacterianas distintas (8).

Las formas de resistencia bacteriana son:

Resistencias naturales	{ de especie de cepa bacteriana
Resistencia por selección de mutantes (adquirida)	{ rápida, de tipo estreptomicínico lenta, de tipo penicilínico
Resistencia por mutación genética	{ transformación conjugación transducción

Los mecanismos fundamentales por los cuales un microorganismo puede manifestar una resistencia natural, o bien adquirida ante un medicamento son: a) la inactivación extracelular, b) la inactivación intracelular, c) la escasa penetración intracelular y d) la falta de estructuras biológicas receptoras.

Según la modalidad con que expresan su farmacorresistencia, se pueden subdividir las bacterias en dos tipos fundamentales, bacterias farmacotolerantes y bacterias farmacodestructoras. Son numerosas las especies bacterianas que pueden neutralizar los agentes quimioterapéuticos mediante la producción de en

zimas específicas, extracelulares e intracelulares. Así, todos los antibióticos del grupo beta-lactámico (penicilina G, penicilina semisintética, cefalosporina) presentan en su molécula un anillo lactámico, que constituye el punto activo de estos fármacos (8).

La penicilinasasa, químicamente una beta-lactamasa, al hidrolizar el anillo lactámico de la penicilina G y de la ampicilina, transforma estos dos antibióticos, en sustancias inactivas bacteriológicamente. La producción de penicilinasasa por parte de una bacteria es un fenómeno característico de inducción enzimática, cuando cepas genéticamente predispuestas, entran en contacto con la penicilina, aumentan la producción de la enzima inactivadora. El gene que rige la producción de la penicilinasasa se ha localizado en los plásmidos; estos pueden ser transmitidos a otras cepas primariamente penicilinosensibles y hacerlas, por lo tanto, penicilinoresistentes (8).

Resistencia natural.

La resistencia natural está genéticamente determinada y depende de la ausencia del proceso metabólico afectado por el antibiótico en cuestión. Los microorganismos resistentes naturalmente proliferan, en tanto que los sensibles son destruidos por el agente quimioterapéutico. La resistencia natural puede ser característica de todas las células pertenecientes a una especie, o bien confinada a cepas particulares dentro de dichas especies, y en ciertos casos a algunas células de una cepa única (4, 27).

Resistencia adquirida.

La resistencia adquirida se refiere a la resistencia que se desarrolla en especies bacterianas previamente sensibles y - que puede obtenerse por mutación (espontánea, inducida), adaptación o a través del desarrollo de la resistencia a la droga - (múltiple) de tipo infeccioso (4).

Farmacorresistencia por selección.

Se debe tomar en cuenta que el fenómeno de la resistencia adquirida presenta dos características fundamentales, que son: la farmacorresistencia en una colonia bacteriana se observa solamente en algunos microorganismos y la farmacorresistencia es una característica hereditaria y transmisible a los descendientes (8).

Se ha explicado que la resistencia adquirida puede deberse a un fenómeno natural de mutación espontánea, en el cual cerca del uno por 10^5 a 10^{10} de las células de las especies producidas de novo, presentan diferencias respecto a la cepa madre (4).

Si la bacteria susceptible es expuesta a concentraciones subinhibitorias de drogas antibacterianas, pueden desarrollarse mutantes resistentes mediante mutación inducida, que puede llevarse a cabo en un paso (tipo estreptomicínico) o en series de pasos (tipo penicilínico). En estos casos, la diversa rapidez de aparición de la resistencia está relacionada con el número de genes que rigen este fenómeno (4).

La resistencia de tipo estreptomicínico, se debe probablemente a mutaciones que ocurren en un número de genes diferentes, cada

uno de los cuales es responsable de un ligero incremento de la resistencia. En el otro caso, la resistencia bacteriana se debe a mutaciones que ocurren en los genes más poderosos que confieren un grado considerable de resistencia (4).

El proceso de adaptación presupone que los microorganismos poseen bajas concentraciones de enzimas destructoras de antibacterianos, o potencial para sintetizar dichas enzimas, y que la producción de concentraciones destructoras de éstas, es promovida a través de inducción enzimática, luego de la exposición al antibiótico (4).

Es importante hacer notar que en el caso del fenómeno de mutación espontánea, ésta ocurre independientemente de la presencia del fármaco antibacteriano (8).

Desde el punto de vista clínico, la aparición de farmacorresistencia frente a un determinado antibiótico, y con ello el fracaso terapéutico consiguiente, es sólo la manifestación de la selección de mutantes resistentes operada por la droga Fig. 3 (8).

La resistencia cruzada, que constituye un aspecto de la resistencia por mutación, tiene una importancia especial en la clínica, ya que una infección bacteriana resistente a un tratamiento, puede mostrarse insensible al tratamiento siguiente con un fármaco similar químicamente al primero y, por lo mismo, dotado del mismo mecanismo de acción (8).

La resistencia múltiple a las drogas de tipo infeccioso, es la transferencia in vivo o in vitro de material genético (plásmidos R) que codifican para la resistencia, de una bacteria re--

sistentes a una sensible (6).

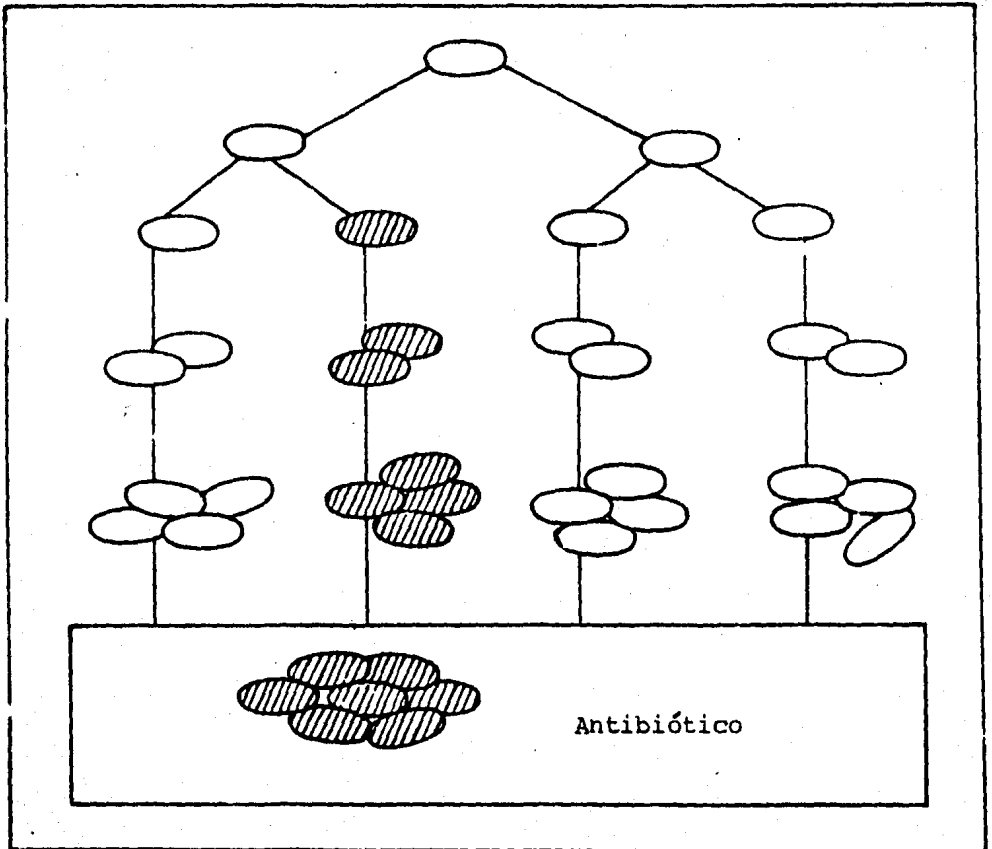


Fig. 3 Esquema de la farmacorresistencia por selección.

El antibiótico desarrolla una actividad selectiva, ya que al suprimir las células sensibles, permite la multiplicación de las resistentes. Se presentan sombreadas las células bacterianas que por mutación espontánea se han hecho resistentes a un determinado antibiótico.

Farmacorresistencia por mutación genética.

El recambio de material genético entre las células bacterianas, aún filogenéticamente muy distintas, constituye uno de los mecanismos por los que una célula bacteriana puede adquirir resistencia, uno de estos procesos es la transformación, además de la conjugación y la transducción (8).

Transformación.

Esta se refiere a la incorporación, por una bacteria sensible, de genes libres (desnudos) provenientes de una célula resistente a la droga (4).

El descubrimiento del proceso de transformación de formas bacterianas no virulentas, lo demostró Griffith en 1928, inoculando a un ratón neumococos vivos en la fase R (colonias de gérmenes no virulentos, desprovistos de cápsula) y neumococos en fase S (colonias de gérmenes virulentos y capsulados, muertos por calor), lo cuál producía la muerte del ratón por septicemia y permitía el aislamiento, de la sangre del animal, únicamente de neumococos de tipo S (8).

Este experimento demostró sustancialmente la posibilidad de la transformación de cepas acapsuladas R en cepas capsuladas S y este fenómeno debía estar relacionado con un factor genético, ya que la transformación era transmisible a los descendientes. Investigaciones sucesivas permitieron aislar de los neumococos el factor responsable de la transformación, constituido por ADN; y al ser una nucleoproteína, es portadora de caracteres hereditarios (8).

La transformación tiene pues, como base, la integración del ADN de un donador con el genoma del receptor; y aunque poco frecuente in vivo, hace posible la transferencia de la farmacoresistencia de célula a célula (8).

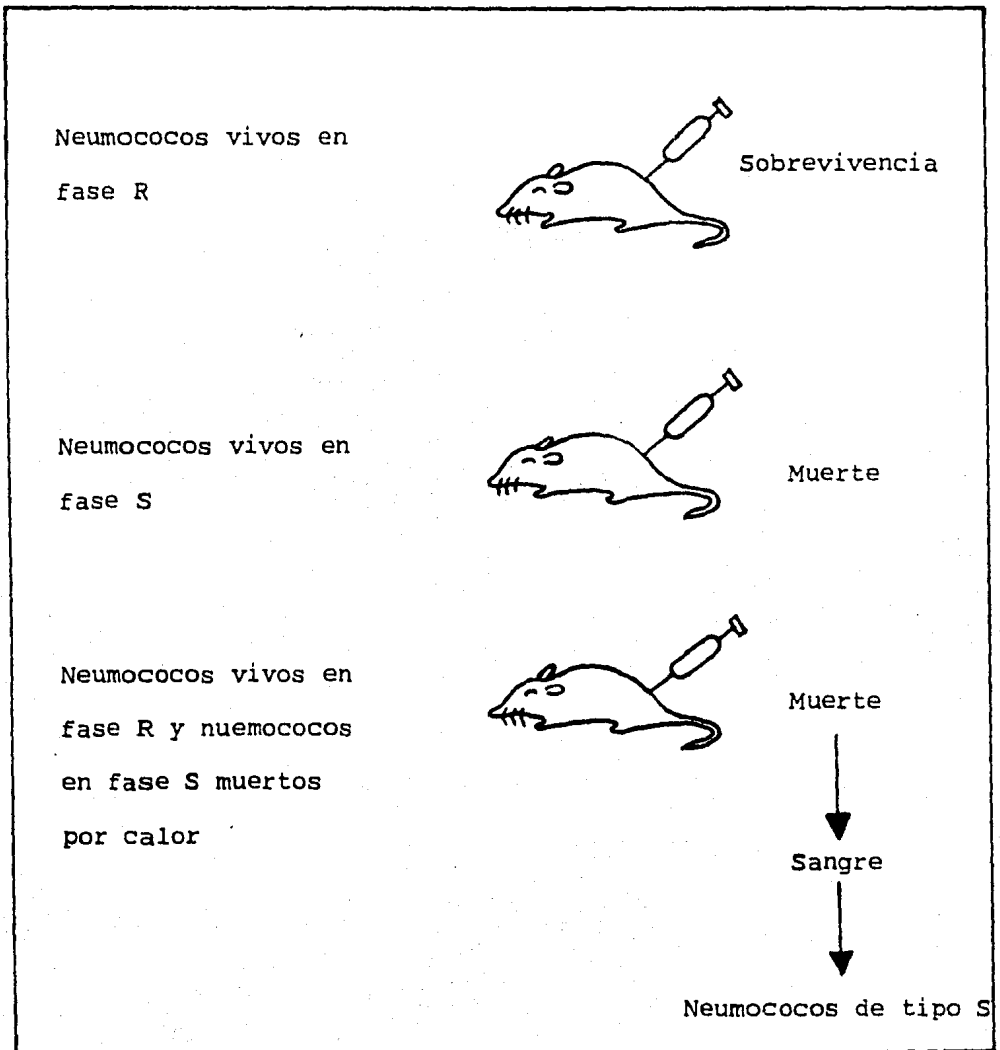


Fig. 4 Esquema de la transformación de los neumococos R en neumococos S.

Conjugación.

La conjugación es un mecanismo de transmisión de material genético entre bacterias, dependiente del contacto de dos células, en este proceso una célula actúa como donador y la otra como receptor de material genético (8).

Para que tenga lugar la conjugación, es necesario que una de las dos células posea el factor llamado de fertilidad o plásmido F. Las células carentes de plásmido F se denominan F^- , las que lo poseen se llaman F^+ .

El factor de fertilidad está constituido por material genético separado del cromosoma bacteriano, capaz de multiplicarse independientemente por sí mismo (8).

El plásmido F confiere a la célula la capacidad de formar una estructura anatómica llamada pili, especie de puente citoplásmico que permite la unión con otra célula y por consiguiente la transferencia del material genético.

Después de la separación, una célula femenina o receptora (F^-) forma células hijas con caracteres del macho o célula donadora (F^+). En el proceso de conjugación, durante el acoplamiento, se puede transferir parte del cromosoma bacteriano y con eso, los genes de la farmacorresistencia (resistencia cromosómica) o bien plásmidos especiales llamados R, portadores de los genes de la resistencia múltiple (resistencia extracromosómica)

Fig. 5.

Los plásmidos R están constituidos por una nucleoproteína circular superenrollada (ADN), y son portadores autónomos extracromosomales de la herencia bacteriana (8).

Los plásmidos R, en forma semejante a la del cromosoma bacteriano y de los plásmidos F pueden autoduplicarse, permitiendo de esta manera la transmisión de las características hereditarias. Dichos elementos extracromosómicos o plásmidos consisten de un segmento, llamado factor de la transferencia de la resistencia (FTR), y otro segmento que contiene los determinantes genéticos individuales de la resistencia a antibióticos y drogas quimioterapéuticas sintéticas. Los FTR contienen información genética, la expresión fenotípica que habilita a la bacteria para conjugarse y realizar la transferencia de plásmidos R sintetizados de novo Fig. 6 (8).

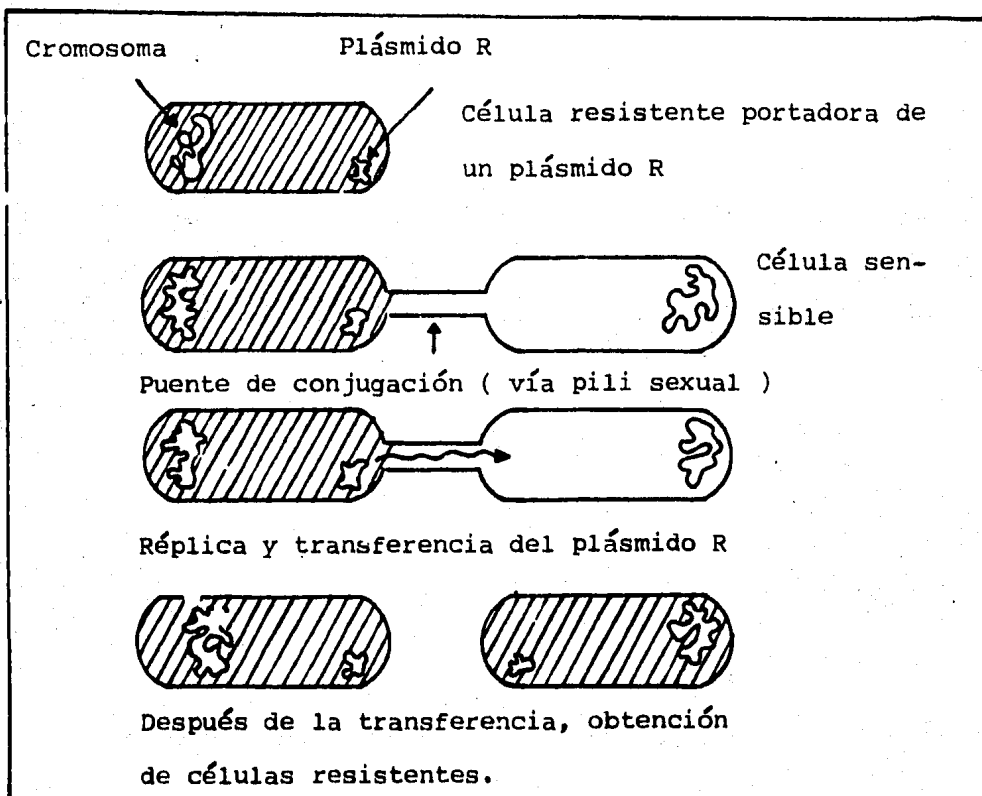


Fig. 5 Esquema de la transmisión de la resistencia por conjugación (27).

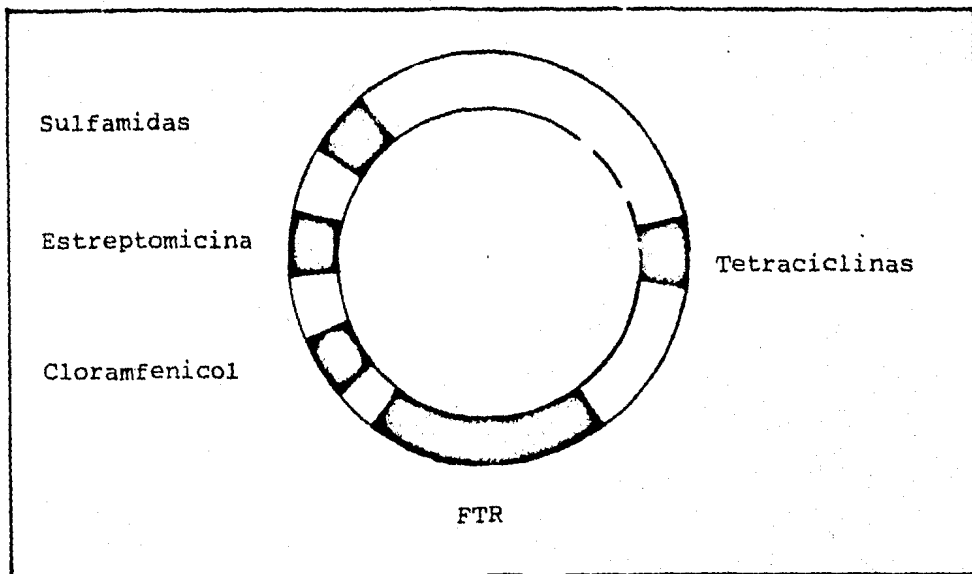


Fig. 6 Representación esquemática del plásmido R de bacterias Gramnegativas - (FTR- factor de la transferencia de la resistencia, gene que regula el - traslado del plásmido R) (16).

Así, la conjugación depende de la presencia de un plásmido contenido en la célula bacteriana; la célula bacteriana resistente a la droga (tipo masculino) pasa los plásmidos R y el factor para la transferencia de la resistencia (FTR) a una célula - sensible a la droga (tipo femenino) vía el pili sexual, cuya formación es inducida por el FTR para realizar la conjugación - de la célula F^+ (4). De esta manera, es conferida a la célula F^- la farmacoresistencia múltiple, así como la capacidad para, a su vez, transferirla a otra célula (8, 16).

Empleando cepas con cromosomas marcados, se ha encontrado que -

la transferencia de la resistencia ocurre normalmente sin transferencia de los marcadores cromosómicos, lo que indica que los factores de resistencia farmacológica transferible, son elementos extracromosómicos o citoplásmicos (8).

Otra prueba indiscutible que apoya la naturaleza citoplásmica de los factores de la resistencia transferible, la proporciona el hecho de que ésta se puede "curar" mediante ciertas sustancias como los colorantes de acridina, capaces de destruir los elementos extracromosómicos (8).

Transducción.

El proceso de transducción, consiste en un mecanismo de transmisión genética de una bacteria a otra mediante un virus particular, los bacteriófagos, que pueden infectar determinadas células bacterianas, siendo marcadamente específicos para ciertas células huésped. Cuando un fago encuentra una bacteria, se fija a ella con su extremidad caudal e inyecta en su interior el material genético propio. La célula infectada inicia entonces la producción de ADN fágico y la reconstrucción de nuevos fagos completos que terminan por destruir a la célula bacteriana (8).

El fago inyecta su ADN en el interior de una célula portadora de un gene del que depende la farmacorresistencia. Con la multiplicación de los nuevos fagos, el gene de la resistencia puede quedar incorporado en el ADN de un fago de nueva formación, y a partir de él ser transmitido a una célula bacteriana sensible, confiriéndole la farmacorresistencia (8).

Existe un tipo particular de fagos que no provocan necesariamente la lisis celular, sino que pueden permanecer en el huésped integrándose en el genoma bacteriano, a estos fagos se les conoce con el nombre de moderados.

El ADN viral integrado al cromosoma bacteriano por cruzamiento recíproco entre el ADN del fago y de la bacteria, pierde temporalmente la capacidad de duplicarse, llamándosele entonces al ADN fágico, profago, el cual de improviso puede pasar de esta forma a la vegetativa y por lo tanto, reproducirse en forma similar a como lo hace el fago virulento. Los nuevos fagos pueden contener fragmentos del material genético bacteriano, bien cromosómico o extracromosómico, y así transportar pasivamente algunas características hereditarias de una bacteria a otra, como podrían ser los genes de la resistencia a uno o más antibióticos Figs. 7 y 8 (8).

Los plásmidos, como los factores F y R, son elementos extracromosómicos con capacidad de autoduplicarse de acuerdo al ciclo reproductivo de la célula; y cuya estructura molecular parece ser de tipo nucleoprotéico (8).

Pueden existir plásmidos depositarios de genes que rigen la producción de enzimas que confieren la resistencia a determinados antibióticos, o bien, plásmidos portadores de determinantes genéticos de la resistencia a algunos agentes quimioterapéuticos (8).

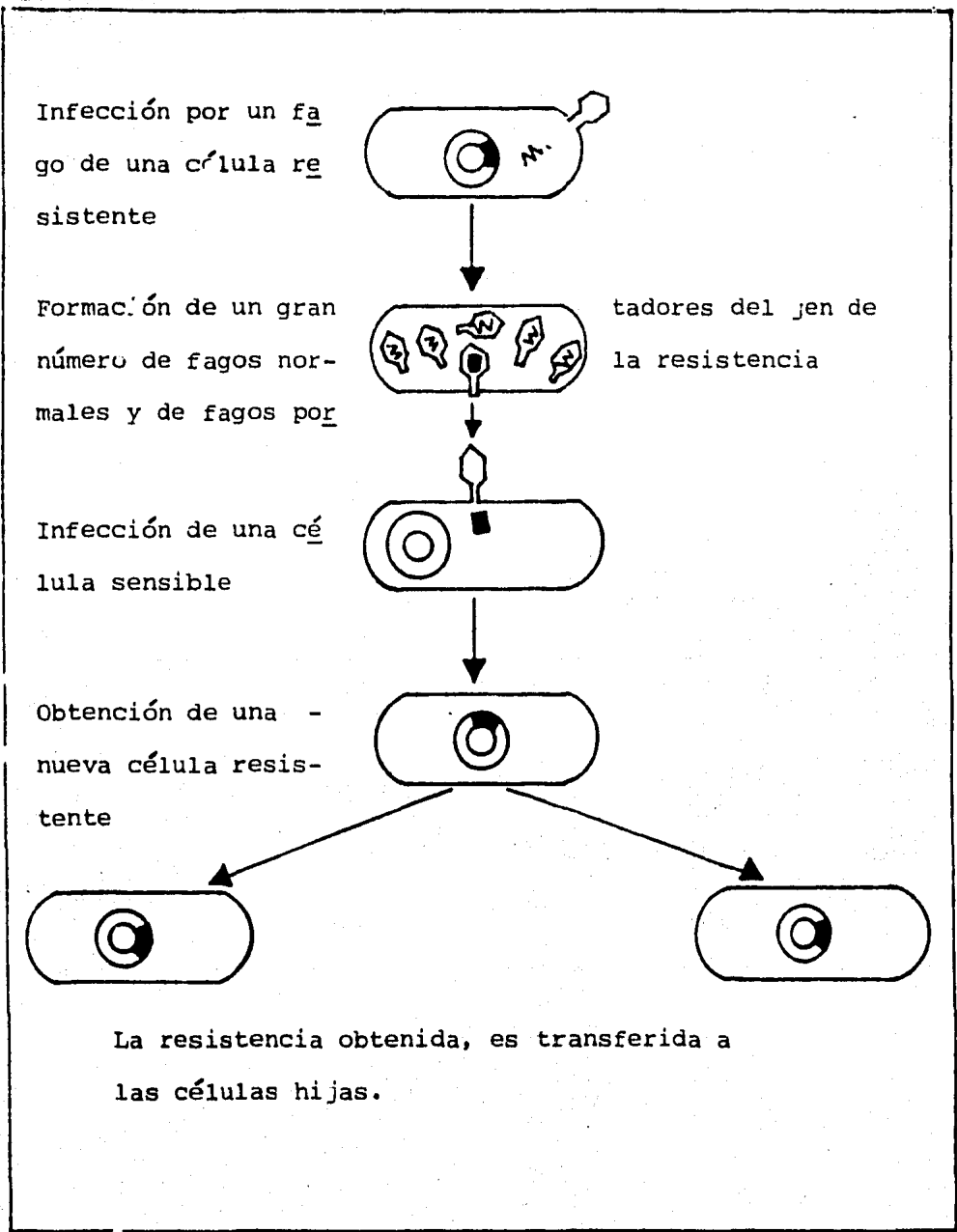


Fig. 7 Esquema de la transferencia de material genético de un microorganismo a otro mediante la transducción.

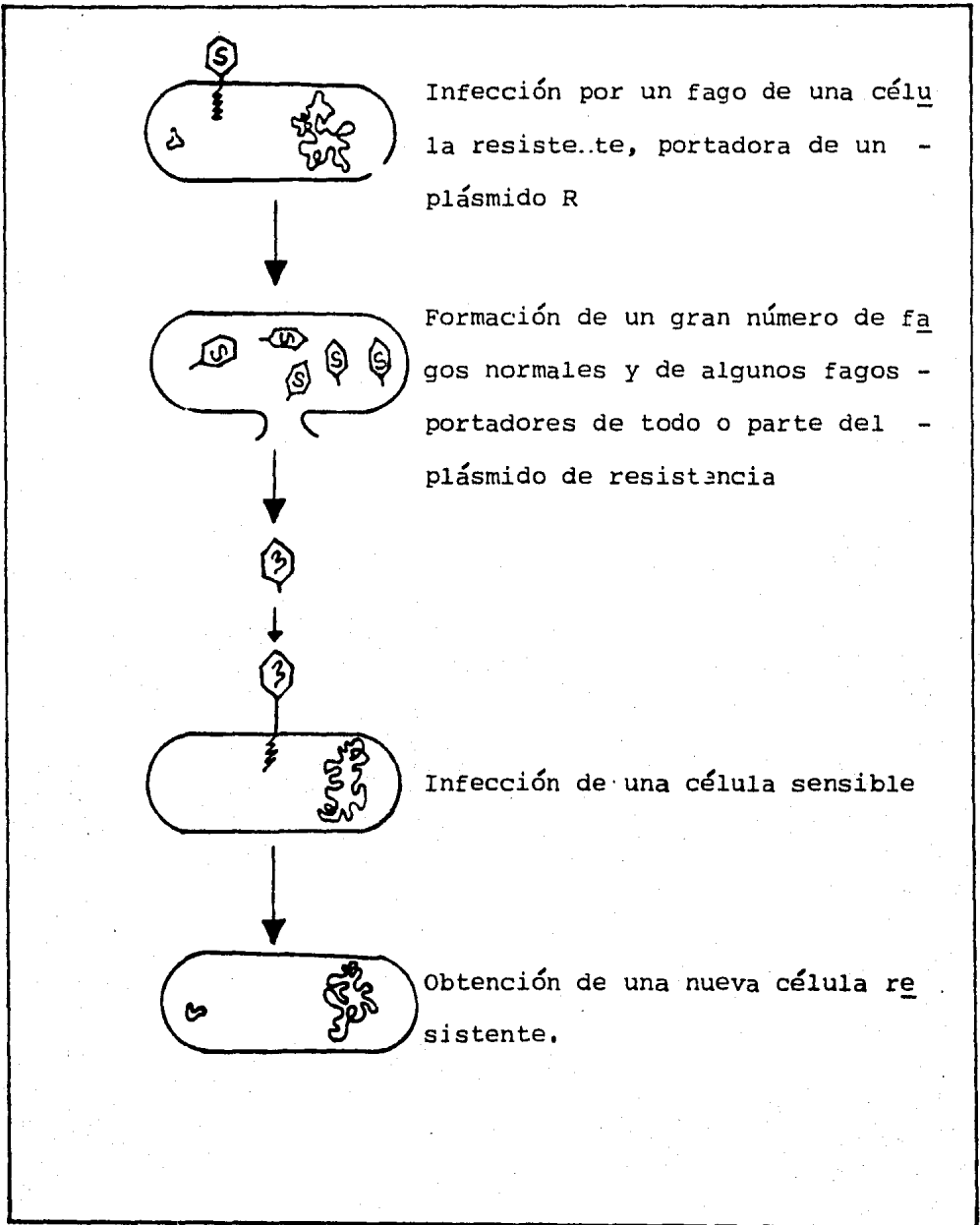


Fig. 8 Esquema de la transmisión de resistencia extracromosómica por transducción (27).

Resistencia de Pseudomonas aeruginosa a los agentes antimicrobianos.

La elección de antibióticos para el tratamiento de enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa se ha tornado muy complicado, ya que la mayoría de las cepas son resistentes a los antibióticos más comunmente usados y un gran número de dichas enfermedades son causadas por cepas nosocomiales que presentan resistencia a muchas de las drogas antipseudomonas. De esta manera, los antibióticos que pueden usarse en pacientes con este tipo de enfermedades pertenecen a cuatro grupos: polimixinas, fosfomicina, aminoglucósidos y antibióticos del grupo beta-lactámico (24).

Resistencia de Pseudomonas frente a las polimixinas.

En general, la colimicina resulta bastante efectiva in vitro, existiendo una baja frecuencia de desarrollo de resistencia y hasta ahora no se conoce el caso de resistencia mediada por plásmidos (24).

Un mecanismo por el que Pseudomonas aeruginosa se vuelve resistente a los antibióticos, es por pérdida de la permeabilidad a través de la envoltura celular. La resistencia frente a las polimixinas involucra alteraciones ultraestructurales y químicas de la membrana exterior, como serían una reducción en el lipopolisacárido, una gran reducción en el contenido de proteínas de la membrana exterior, una reducción en la concentración de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} , así como alteraciones de los lípidos.

Se han propuesto dos mecanismos diferentes como las posibles ba

ses moleculares para la resistencia adaptativa a las polimixi--nas, que pueden resumirse en lo siguiente. La pérdida de las - proteínas específicas de la membrana exterior, responsables de la penetración de la molécula de polimixina, da como resultado una pérdida de la permeabilidad de la membrana exterior para - las polimixinas, o bien cambios en la composición lipídica o lipopolisacárida de la envoltura celular, dando como resultado - pérdida de la capacidad de unión de la polimixina.

Un mecanismo molecular alternativo para explicar la resistencia de Ps. aeruginosa a las polimixinas lo han propuesto Nicas y - Hancock, quienes exponen que el incremento en la cantidad de - proteína H_1 unida a las moléculas lipopolisacáridas en los si--tios que son capaces de producir una unión con las polimixinas, produce la reducción del número de sitios de unión disponibles para las polimixinas (24).

En la terapia común, las polimixinas permanecen aún como drogas de elección en situaciones que involucran el tratamiento de enfermedades causadas por cepas de Pseudomonas resistentes hacia otros antibióticos. En ocasiones, el uso de la colimicina en - combinación con otras drogas puede ejercer actividad sinérgica (24).

Resistencia de Pseudomonas frente a la fosfomicina.

El empleo de la fosfomicina representa una alternativa clínica--mente útil, ya que además de que esta droga tiene una actividad inmediata, no existe resistencia cruzada entre este antibiótico y las otras drogas antipseudomonas; sin embargo, un inconvenienu

te considerable de la fosfomicina, es el rápido desarrollo de - resistencia cromosomal y a pesar de que las mutantes normalmente tienen menor virulencia en este caso, pueden esperarse recaídas en muchas ocasiones (24).

Resistencia de Pseudomonas frente a los aminoglucósidos.

Se ha demostrado la presencia de cepas de Pseudomonas resistentes a los aminoglucósidos, debido a la capacidad de producir enzimas inactivadoras de dichos antibióticos, estas enzimas son - codificadas por plásmidos de resistencia que pueden transferirse de especie a especie.

Se han definido tres tipos de enzimas: enzimas fosforilantes de los grupos hidroxilo, enzimas adenilantes de los grupos hidroxilo y enzimas acetilantes de los grupos amino, que al ejercer su acción específica sobre los aminoglucósidos, causan la inactivación de los mismos (24,27).

Algunas cepas resultan resistentes a los aminoglucósidos debido a la inhabilidad de los mismos de penetrar la pared celular, dicha resistencia es codificada cromosomalmente y da como resultado una resistencia cruzada entre los diferentes aminoglucósidos (24).

Los aminoglucósidos se consideran aún como drogas de primera - elección, usándose como agentes simples en el tratamiento de enfermedades por Pseudomonas, si estas son fácilmente accesibles, ya que son bactericidas que actúan rápido; sin embargo, en la - mayoría de los casos de padecimientos sistémicos con significancia clínica, causados por Pseudomonas, se indica una terapia -

combinada de un aminoglucósido y un antibiótico del grupo beta-lactámico, ya que a menudo actúan en forma sinérgica en contra de Pseudomonas, además de que previene el desarrollo de resistencia por parte de Pseudomonas hacia penicilinas activas para este género.

Resistencia de Pseudomonas frente a los antibióticos del grupo beta-lactámico.

Entre los antibióticos del grupo beta-lactámico con actividad antipseudomonas se encuentran las penicilinas y las cefalosporinas.

La resistencia de las especies de Pseudomonas frente a los compuestos beta-lactámicos involucra dos mecanismos: exclusión de la droga e inactivación hidrolítica (5).

Se ha definido un mecanismo intrínseco de resistencia en las especies de Pseudomonas que da como resultado la exclusión de los compuestos beta-lactámicos de los sitios blanco, es decir, los sitios de síntesis del peptidoglicano en el exterior de la membrana citoplásmica. Esta exclusión se asocia con las propiedades de permeabilidad de las capas exteriores de la envoltura celular, que son barreras efectivas para prevenir el acceso directo de los compuestos beta-lactámicos a los sitios blanco (5). La presencia de una barrera de permeabilidad en la envoltura celular, puede actuar potenciando la acción de las beta-lactamas unidas a la célula, en caso de que existan, de manera que niveles relativamente bajos proporcionan un mecanismo de protección celular efectivo (5).

Así, la estructura de la envoltura de la célula en las especies de Pseudomonas juega un papel importante en el mecanismo intrínseco de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos estableciendo una barrera de permeabilidad (5).

Las especies de Pseudomonas producen también enzimas que hidrolizan la unión amida cíclica en el anillo beta-lactámico de las penicilinas y cefalosporinas y se conocen colectivamente con el nombre de beta-lactamasas; dichas enzimas pueden ser codificadas por cromosomas o plásmidos de resistencia (plásmidos R). Las beta-lactamasas mediadas cromosomalmente, generalmente son inducibles y tienen una alta actividad contra las cefalosporinas, además de encontrarse universalmente presentes en Ps. aeruginosa.

Las generalmente infrecuentes beta-lactamasas mediadas por plásmidos R, son constitutivas y algunas de ellas se caracterizan por su capacidad de hidrolizar la carbenicilina a alta velocidad. Hasta el momento se reconocen varios tipos de beta-lactamasas constitutivas codificadas por plásmidos R, con perfiles de sustrato específicos para cada enzima, de las cuales la mayoría se encuentran en Ps. aeruginosa (5).

Estudios clínicos de los antibióticos beta-lactámicos indican claramente que no pueden usarse como agentes simples para el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por Pseudomonas debido al gran desarrollo de resistencia cruzada hacia todos los miembros del grupo, ya sea mediante el mecanismo de exclusión de la droga o de inactivación hidrolítica, por lo que en estos casos debe combinarse una penicilina antipseudomonas -

con otro antibiótico también activo, preferiblemente un aminoglucósido (24).

En el caso de los demás agentes antimicrobianos empleados en el trabajo experimental, dado que no son drogas de elección para el tratamiento de enfermedades causadas por Ps. aeruginosa, no existe bibliografía que indique los mecanismos de resistencia de este microorganismo hacia las drogas respectivas.

Terapia antimicrobiana de enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa.

A causa de la dificultad que implica la terapia de las enfermedades causadas por Ps. aeruginosa usando drogas como agentes simples, principalmente cuando se trata de enfermedades sistémicas, se han tratado de encontrar rutas terapéuticas nuevas como son la combinación de antibióticos; así, estudios in vitro han demostrado actividad sinérgica contra Pseudomonas entre aminoglucósidos y beta-lactámicos. Este fenómeno puede explicarse por el efecto que ejercen los antibióticos del grupo beta-lactámico sobre la pared celular bacteriana, facilitando la penetración del aminoglucósido a la célula, potenciando de esta manera la acción del último en contra del microorganismo (24).

Recientemente se ha iniciado el empleo de la inmunoterapia, tanto activa (vacuna polivalente) como pasiva (gamma globulina hiperinmune) en pacientes quemados, en los que la infección por Ps. aeruginosa es generalmente mortal, proporcionando un pronóstico exitoso en la mayoría de los casos (9, 14).

Evaluación del uso de antibióticos y prevención del desarrollo de resistencia.

La aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, guarda estrecha relación con el empleo de los mismos en el tratamiento de enfermedades en el hombre. Se ha estudiado que un gran porcentaje de los casos que involucran la administración de antibióticos dentro de un hospital, en las condiciones médicas, no requiere tratamiento antibiótico; además, no se emplean las drogas más eficaces y más baratas, o bien, la dosis y la duración de la terapia, no se prescriben correctamente (6, 17).

Según lo antes mencionado, gran parte del uso creciente que se hace de los medicamentos antimicrobianos es innecesario, en muchas ocasiones se emplean sin previo examen clínico o de laboratorio. No indica esto que el análisis de laboratorio sea siempre factible o necesario, pero hay muchos casos en que el tratamiento sólo puede aplicarse racionalmente si se dispone de datos obtenidos en cultivos. Igualmente se emplean mal los antibióticos en casos de enfermedades de etiología viral, en infecciones bacterianas leves que no requieren esa clase de tratamiento y en numerosos casos de diarrea en que son ineficaces y en ocasiones indeseables. La disponibilidad de una amplia variedad de drogas, particularmente antibióticos, promueve su uso indiscriminado bajo la dirección de médicos, veterinarios y aún incluidos en la comida animal, causando una tensión ambiental que puede seleccionar cepas de bacterias cuya resistencia a los antimicrobianos se transmite por plásmidos; además existen

otros factores, como las presiones ejercidas por los enfermos y sus familiares, y la propaganda de la industria farmacéutica - (6, 17).

Aunque es difícil controlar la utilización de antibióticos en el hombre, se debe hacer todo lo posible para racionalizar su uso, dando importancia al establecimiento de programas educativos respecto al diagnóstico de las enfermedades que pueden requerir terapia antimicrobiana (6).

Como se mencionó anteriormente, el aumento de la resistencia a los antibióticos está también vinculado al empleo de estos medicamentos en animales, así como la adición de antibióticos a los piensos, ya sea para favorecer el crecimiento, o para la conservación de los mismos; por todo lo mencionado, se ve que es necesario que los veterinarios, lo mismo que los médicos, reciban información sobre el empleo adecuado de los antibióticos (6). Otro factor importante que puede favorecer la diseminación de bacterias resistentes a los medicamentos, lo constituye el medio ambiente (aguas de superficie, aguas de alcantarillado, alimentos, etc.) que se están contaminando constantemente con dichos microorganismos, fenómeno que es preciso vigilar y, en lo posible, controlar adecuadamente, siendo necesario establecer un programa de vigilancia sobre las bacterias patógenas principalmente.

La información sobre las formas de resistencia que pueden presentar las principales bacterias patógenas frente a los medicamentos, y la aparición de nuevas características de resistencia, tiene sumo valor para la selección adecuada de agentes an-

timicrobianos con fines terapéuticos. Además, un programa nacional de vigilancia, permite detectar rápidamente la aparición de cepas multirresistentes, facilitando a los clínicos la orientación necesaria para elegir el agente antimicrobiano más adecuado, sin necesidad de proceder a un exámen de laboratorio del material aislado, pudiendo evitar el empleo a ciegas de múltiples antibióticos (6).

En los países desarrollados, así como en los países en desarrollo, se llevan a cabo investigaciones de laboratorio para determinar qué microorganismos causan infecciones en el hombre, y se efectúan pruebas de sensibilidad con fines clínicos, como orientación para el tratamiento. En muchos países, esa clase de datos ha permitido también obtener material epidemiológico para determinar la incidencia de las bacterias resistentes en las infecciones humanas, lo mismo en los hospitales que en la población general (6).

Aunque es difícil vigilar el uso de los antibióticos en el hombre, debe hacerse todo lo posible para que estos se empleen de manera racional. Por ello conviene vigilar la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, establecer comités nacionales sobre el uso de antibióticos, y distribuir por todo el país información sobre las modalidades de sensibilidad a los antibióticos, con los perfiles de empleo de estos medicamentos (6).

Sería conveniente considerar las siguientes proposiciones para el mejoramiento del uso de antibióticos:

- 1) Deben adoptarse medidas para mejorar la formación de los estudiantes y de los médicos en el problema de la resistencia a

los medicamentos, haciéndoles comprender la importancia de una quimioterapia racional contra las enfermedades bacterianas.

2) Debe controlarse la propaganda de la industria farmacéutica, para evitar presiones de los representantes de estas compañías sobre los médicos.

3) Debe establecerse un formulario que señale las drogas posibles de usar de acuerdo a sus ventajas, costos, etc.

4) Se sugiere también la suspensión temporal del uso común de algunos antibióticos, para favorecer la reinstalación de las cepas susceptibles, permitiendo la pronta reducción y desaparición eventual (o aparente desaparición) de las variantes resistentes a dichos medicamentos y, así, lograr posteriormente un mayor rendimiento de estos agentes antimicrobianos.

Considerando estos puntos como constituyentes de un método de control sobre el uso de los agentes antimicrobianos en hospitales, aunado a los programas de vigilancia de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos, que permiten evaluar constantemente estos problemas que se plantean, alertando al mismo tiempo sobre los brotes inminentes de infección por tales bacterias, suministrarían las bases de una terapia racional antibiótica y ayudarían a las autoridades sanitarias a establecer políticas nacionales en relación con los medicamentos (6, 17, 19).

1.4 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD (2, 18).

Determinar la susceptibilidad a los antibióticos es una actividad de aplicación práctica por excelencia, que influye de manera radical en la evolución de muchas enfermedades infeccio-

sas, respecto al tratamiento de las mismas, para mejorarlas en la mayoría de los casos. En los últimos tres decenios la Microbiología Clínica tuvo auge, sólo comparable al descubrimiento - paralelo y desarrollo de los modernos agentes antimicrobianos. Desde el punto de vista tradicional, en la infección intervenían el microorganismo y el huésped; hoy, en cambio, hablamos con mayor propiedad de la tríada de la infección, que se representa como un triángulo (huésped, bacteria y agente antimicrobiano) que refleja el gran cambio derivado de la introducción de los antibióticos en la terapéutica de las enfermedades bacterianas. Para que el clínico emprenda una terapia antibacteriana racional, el laboratorio debe proveerle: 1) la identidad del microorganismo o de los microorganismos infectantes y, 2) una guía exacta y fidedigna sobre los antibióticos que pueden o no pueden usarse, es decir, que antibióticos resultan eficaces in vivo. En un principio se desarrollaron investigaciones extensas con modelos animales, para establecer la actividad de un antibiótico administrado para el tratamiento de una determinada enfermedad bacteriana. Este enfoque, además de resultar costoso - en tiempo y dinero, no orientó respecto a las guías terapéuticas que se buscaban, por esto, se procuró idear y perfeccionar pruebas de susceptibilidad in vitro que con una interpretación correcta, ofrecieran la información necesaria.

El desarrollo de dichos métodos entonces fué enorme, desarrollándose varias técnicas y modificaciones de las mismas; sin embargo, no se habían desarrollado controles de producción o de procedimientos, por lo que se llegó a que los laboratorios, en algunos casos proveían resultados incorrectos o interpretacio-

nes erróneas de sus resultados, cuando no ambas. Esto hizo que la Administración de Alimentos y Drogas en E.E.U.U. (F.D.A.), dictase disposiciones para controlar la fabricación de discos - impregnados con antibióticos y se hizo labor para el desarrollo de técnicas o procedimientos que proveyesen datos coherentes, - entendiendo por éstos, un medio para saber si un microorganismo dado era susceptible o sensible a un determinado antibiótico en una concentración dada.

Los últimos 10 años fueron muy fructíferos en cuanto a innovaciones positivas y correctivas. Se han identificado y se pretenden eliminar las prácticas que no sean útiles, no reproducibles o no bien definidas y sólo permanecerán los métodos que puedan controlarse, cuyos resultados son reproducibles y se prestan para una interpretación acorde con las líneas de definición dadas por la Organización Mundial de la Salud, de lo que se entiende por microorganismo susceptible. Se considera que una bacteria - es susceptible a un determinado agente antimicrobiano, si la - concentración del antibiótico requerida para producir la inhibición del crecimiento de esa bacteria in vitro, es menor a la - concentración que se alcanza in vivo en el humano. Esta definición, sin embargo, no considera tres factores: 1) que los mecanismos de defensa del huésped pueden tener un efecto aditivo o de antagonismo frente al antibiótico, 2) que la dosis máxima o media de una determinada droga, origina distintos niveles de - concentración sanguínea de acuerdo al individuo, de modo que el aumento o disminución de los niveles sanguíneos de la droga - tras su administración varían y, 3) que el nivel sanguíneo pue-

de no guardar ninguna relación con la concentración de la droga en el sitio de la infección. A pesar de sus deficiencias, esta definición de susceptibilidad antibiótica todavía rige y fué el eje alrededor del cual subsistieron los buenos métodos de ensayo antimicrobiano. Los procedimientos de laboratorio que se refieren a agentes antimicrobianos, se llevan a cabo comúnmente -- en medio de agar. Para determinar la susceptibilidad del microorganismo frente a un agente antimicrobiano, se miden cantidades de la droga que serán incorporadas a un medio de agar, que se inocula posteriormente con el microorganismo que será probado. Después de una incubación adecuada, se puede determinar si éste es capaz de crecer en presencia de esa cantidad de antimicrobiano. Cuando se prepara una serie de cajas de petri con cantidades variables del antibiótico a probar, se puede determinar la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento del microorganismo (concentración inhibitoria mínima o CIM). Dichas pruebas de dilución de la droga, llevadas a cabo en medio de agar, se determinan comúnmente como procedimientos de dilución en agar, opuestamente a los procedimientos de dilución en tubo que se llevan a cabo en medio líquido.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, mejor que preparando diluciones de la droga, se pueden realizar por métodos de difusión en agar. En estos métodos, una concentración determinada del antimicrobiano se aplica a un reservorio en un medio de agar inoculado y la droga tiende a difundir en el medio que le rodea. Esto expone al microorganismo sometido a prueba, a un gradiente continuo de concentraciones (menores a distancias ma

yores del reservorio y viceversa).

Así mismo, han sido ideados métodos de automatización de estas pruebas de susceptibilidad, que tienen por objeto la minimización del tiempo de realización de la prueba, además de la disminución del gasto de reactivos.

Pruebas de susceptibilidad de dilución en agar.

Para determinar la CIM para uno o más aislamientos bacterianos, la droga en estudio debe ser incorporada a un medio de agar licuado entre 45 - 50°C y mezclado, para ser depositado posteriormente en cajas de petri con el fin de que solidifique. Se prepara una serie de cajas con concentraciones crecientes de la droga, y con la ayuda de un replicador múltiple de inóculo, pueden ser inoculadas hasta 36 diferentes cepas bacterianas en una misma placa.

Después de incubar durante la noche, la CIM se lee como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, que representa entonces un punto final cuantitativo que se ha usado para comparar la susceptibilidad de una cepa bacteriana dada, frente a la inhibición causada por varios antimicrobianos, o bien, para estimar la susceptibilidad relativa para un agente antimicrobiano, en series de aislamientos de una o diferentes especies.

Factores que influyen las pruebas de dilución en agar.

1.- Naturaleza del agar. La composición del medio es uno de los factores que más afectan los resultados y la reproducibilidad -

de las pruebas de susceptibilidad, de este modo se han sumarizado los requerimientos del medio ideal, como se describe a continuación: a) el medio ideal debe ser capaz de permitir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos para los que se requieren pruebas de susceptibilidad, sin requerimiento adicional, b) el contenido del medio debe ser definido, describiendo los procesos de producción de sus componentes, como la peptona y el agar, c) los resultados de las pruebas de susceptibilidad deben ser reproducibles para diferentes lotes de medio e incluso, para distintas marcas comerciales, d) el medio debe estar libre de sustancias antagónicas a los agentes antimicrobianos que se prueban comúnmente, e) el medio no debe estar sujeto a cambios marcados en el pH, durante el crecimiento de los microorganismos, f) el agar y el caldo del medio deben tener la misma formulación, excepto por la presencia o ausencia del agente solidificante y, g) el medio debe ser aproximadamente isotónico para las bacterias.

En la mayoría de las pruebas de susceptibilidad, el medio Mueller-Hinton es recomendado, ya que permite que el microorganismo prueba crezca en este medio. El agar de Mueller-Hinton puede ser suplementado con sangre, derivados de la sangre u otros factores, por lo que la técnica de dilución en agar se prefiere comúnmente para microorganismos prueba exigentes nutricionalmente. El agar de Mueller-Hinton cumple con la mayoría de los requisitos necesarios para obtener datos fidedignos.

2.- Naturaleza de los diluyentes de los antibióticos. Cuando las soluciones antibióticas se obtienen en solventes con activiz

dad antibacteriana potencial, el volumen total de la solución -
antibiótica añadida al agar, debe reducirse en lo posible a 0.2
ml en 20 ml de agar.

3.- Almacenamiento de las placas de agar. El almacenamiento de
las placas de agar bajo las condiciones de refrigeración, pue-
de producir tres tipos de cambios:

i) Inactivación gradual del antimicrobiano, especialmente con -
las drogas más lábiles; sin embargo, las CIM_s generalmente no -
se afectan hasta que se ha perdido el 50 % de la actividad o -
más.

ii) Una pérdida de la humedad por evaporación, puede producir -
un aumento en la concentración del antimicrobiano remanente.

iii) La calidad nutritiva del medio puede afectarse por pérdida
en la humedad debida a la evaporación. En base a ésto, se reco-
mienda almacenar las cajas en bolsas de plástico selladas, mini-
mizando así la posibilidad de evaporación. El deterioro de las
placas puede disminuirse, manteniendo constante la temperatura
del refrigerador.

4.- Densidad del inóculo. Con el objeto de obtener resultados -
reproducibles, la densidad del inóculo debe ser estandarizada -
cuidadosamente. En las pruebas de susceptibilidad de dilución -
en agar, cada sitio de inoculación debe contener aproximadamen-
te 1×10^4 células viables, que pueden variar de 5×10^3 a -
 5×10^4 células viables por sitio de inoculación.

5.- Inoculación de las placas. En el método de dilución en agar,
es común realizar la inoculación de un gran número de microorga-
nismos prueba en la misma placa de agar. Teóricamente, el creci

miento de un organismo puede afectar el de otro que crezca en un sitio adyacente, ya sea por reducción en la concentración del antimicrobiano, disminución de nutrientes, o por la acción de enzimas inactivadoras de la droga en caso de que uno de estos microorganismos las produzcan, ya que la concentración del antimicrobiano en el medio adyacente puede reducirse y así permitir el crecimiento de microorganismos completamente susceptibles a la droga. Sin embargo, éste es un inconveniente teórico y no práctico, debido a que las cepas de prueba individuales son colocadas al menos a una distancia de 5 - 7 mm, evitando que las cepas crezcan juntas.

6.- Incubación de las placas. Las placas se incuban a 35°C de 16 a 20 horas, una incubación prolongada puede producir un incremento en las CIM_s en el caso de antibióticos que sean inactivados en forma progresiva con un tiempo de incubación prolongado (penicilinas, cefalosporinas).

Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos en medio líquido.

Observaciones sistemáticas del efecto de los agentes antimicrobianos sobre microorganismos específicos, involucran la incorporación del antimicrobiano directamente en el medio de crecimiento líquido. Se realizan estimaciones cuantitativas del grado de actividad del agente antimicrobiano contra el microorganismo, por inoculación de una suspensión de éstos, en medio con diluciones seriadas del agente. La concentración más baja de la droga que previene un crecimiento visible luego de 18 a 24 horas de incubación, se considera la concentración inhibitoria mínima o CIM.

Así, la CIM obtenida usando diluciones consecutivas del doble de concentración, se ha usado como referencia para comparaciones de exactitud con otras técnicas.

El procedimiento de dilución en tubo con medio líquido permite una determinación simultánea de la concentración bactericida mínima (CBM), y en algunos casos puede ser usada para pruebas con combinaciones de drogas para detectar sinergismo.

En ocasiones el control de calidad puede dificultarse, por errores de dilución que no se pueden detectar, por la contaminación que puede producir un error en la interpretación ya que no puede detectarse, y el deterioro de antibióticos o reactivos stock, que es un peligro constante.

Los rangos de concentraciones de las diluciones de antibióticos deben tomar en cuenta los siguientes aspectos:

a) Niveles en fluidos biológicos.- Las concentraciones probadas deben estar comprendidas en el rango que involucra las concentraciones más altas encontradas en los fluidos biológicos, y en ocasiones, exceder por una dilución dichas concentraciones, con el fin de obtener un espectro de susceptibilidad amplio de la cepa probada frente a un antibiótico dado.

b) Grado de susceptibilidad de cada especie bacteriana.- Es decir, debe tomarse en cuenta el grado de susceptibilidad mostrado por una gran cantidad de aislamientos bacterianos de una especie dada, de manera que los rangos de concentraciones escogidos para determinados antibióticos sean efectivos, evitando el uso de concentraciones inútiles.

c) Toxicidad farmacológica.- Para drogas que son tóxicas farma-

cológicamente en un rango estrecho, arriba de los niveles séricos o tisulares, las concentraciones probadas pueden expandirse en una o dos diluciones más, arriba del nivel tóxico, para entrar en los niveles esperados de la droga en orina en dosis normales, cuando ésta pretende emplearse en infecciones de las vías urinarias.

d) Predicción de sinergismo para cepas seleccionadas.- En ciertas enfermedades serias, el tratamiento con una combinación de antibióticos produce un efecto sinérgico bactericida. Así, las pruebas de dilución en caldo, son la base de los métodos cuantitativos de las pruebas de sinergismo.

En casi todos los casos, las diluciones recomendadas para facilitar la preparación del estándar, son diluciones consecutivas del doble de concentración.

Factores que influyen las pruebas de dilución en medio líquido.

1.- Naturaleza del medio. Cuando se realiza la selección del medio que ha de emplearse en este tipo de pruebas, debe considerarse que la actividad de ciertos antimicrobianos se ve influenciada por factores como: cationes presentes en el medio, pH del medio y presencia de materiales antagónicos en general, además de que la capacidad nutritiva del medio tiene gran influencia en la posibilidad de desarrollo del microorganismo prueba.

El medio de Mueller-Hinton, es un medio satisfactorio para las pruebas de dilución en caldo, por lo que se ha designado como un medio de referencia.

2.- Preparación y almacenamiento de las soluciones stock. Las soluciones stock deben ser preparadas a partir de polvos estandarizados de los antimicrobianos, obtenidos directamente de los laboratorios farmacéuticos; dichos polvos estandarizados deben guardarse en refrigeración (-4°C) o congelarse (-20°C); si no están sellados en ampollitas o viales, en un desecador.

Todas las soluciones estándar deben guardarse en congeladores de -20 a -70°C y no deben someterse a congelación y descongelación repetidas. Ciertos agentes requieren solventes específicos en la solución stock para obtener una dilución y preservar la actividad, en general, sólo se requiere un pequeño volumen de solvente.

3.- Densidad del inóculo. La densidad del inóculo debe estandarizarse cuidadosamente para obtener resultados reproducibles y reales.

En las pruebas de dilución en caldo, esta variable es aún más importante que en las pruebas realizadas en agar, ya que en el desarrollo obtenido en el medio líquido, no puede establecerse una estimación aproximada de si la densidad del inóculo fué excesivamente grande o pequeña, contrariamente a lo que se puede apreciar en las pruebas efectuadas en medio de agar. Generalmente se sugiere un inóculo de 1×10^5 y 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/ ml para las pruebas de dilución en macro tubo; para las de microdilución, el inóculo administrado a los pozos de las placas de microtitulación varía usualmente, en el rango de 5×10^3 a 5×10^4 , con inóculo promedio recomendado de 1×10^4 UFC / ml.

4.- Incubación de los tubos. La temperatura de incubación debe mantenerse a 35°C, controlándola durante el curso de los procedimientos de control de calidad. La lectura de los puntos finales de la CIM en el método de dilución en caldo, se realiza luego de incubación usual entre 16 a 18 horas o bien durante la noche.

Dentro de las pruebas de susceptibilidad de dilución en caldo, en general se han desarrollado dos métodos, que se describen a continuación:

Método de macrodilución.- En este procedimiento se inoculan con concentraciones seriadas de diluciones de antibióticos en alícuotas de 1 ml, con 1 ml de suspensiones bacterianas estandarizadas, obteniéndose volúmenes finales de 2 ml. Luego de la inoculación, se procede a la incubación descrita anteriormente.

Método de microdilución.- Este método se basa en el empleo de pequeños volúmenes, debido a esto se creó el término microdilución para designar una prueba de dilución en caldo, en la cual el volumen final, tras de haber añadido el inóculo, es de sólo 0.1 ml. Inicialmente estas pruebas se realizaron manualmente utilizando un sistema de microtitulación empleado para realizar pruebas serológicas.

En la actualidad se han desarrollado técnicas semiautomatizadas y automatizadas, para facilitar la realización de las pruebas de susceptibilidad antes descritas.

Técnicas de dilución en agar contra dilución en caldo.

Las técnicas de dilución en agar tienen cuatro grandes ventajas sobre los métodos de dilución en caldo:

1.- Mediante el uso de un aparato replicador del inóculo, se pueden probar un gran número de cepas al mismo tiempo.

2.- La heterogenicidad microbiana, o la contaminación, pueden detectarse rápidamente mediante la observación de la naturaleza del crecimiento bacteriano en la superficie de las placas de agar, hecho que no sería posible determinar en un medio líquido.

En las pruebas con caldo no hay manera de establecer las variaciones de sensibilidad de un determinado microorganismo frente a un antibiótico, ya que el resultado final está indicado por el comportamiento de las bacterias más resistentes. Una pequeña población de bacterias resistentes puede sobrevivir a una concentración dada de antibiótico, multiplicarse y producir turbidez macroscópica en el caldo. En cambio, las bacterias aisladas de muestras clínicas tienden a ser heterogéneas respecto a su susceptibilidad antimicrobiana, lo cual puede ser observado en el agar.

3.- El medio puede ser suplementado con sangre completa o derivados sanguíneos, para permitir realizar la prueba en microorganismos nutricionalmente exigentes que no pueden ser probados en caldo.

4.- El procedimiento estándar puede modificarse en varios aspectos con el objeto de permitir probar un determinado tipo de microorganismo, pero es necesario que se incluyan los controles -

apropiados , para demostrar que la modificación no puede afectar el resultado final.

A pesar de esto, la mayor desventaja del procedimiento de dilución en agar, es el hecho de que las placas de agar no pueden ser subcultivadas fácilmente con el objeto de determinar la actividad bactericida del antimicrobiano.

Ensayo de la actividad bactericida.

A la concentración mínima de la droga requerida para realizar una inhibición irreversible del inóculo (la muerte), puede llamársele concentración bactericida mínima (CBM) o concentración letal mínima (CLM).

En general, las CBM_s se determinan más convenientemente realizándose en medio líquido, como un procedimiento subsecuente a la determinación de las CIM_s por el método de dilución en caldo, ya sea la dilución en macrotubo o las técnicas de microtitulación.

La concentración bactericida mínima se define como la concentración mínima de la droga que permite la supervivencia de no más de un número mínimo arbitrario de células o una proporción arbitraria mínima de un inóculo definido después de incubación bajo condiciones establecidas por un período determinado (24 horas). Las técnicas de dilución en caldo se pueden realizar en forma relativamente simple para producir la CBM, los pasos adicionales son:

a) Cuantificación de las células bacterianas viables (UFC / ml) del inóculo estandarizado y, b) luego de la incubación es-

tándar de la CIM, realizar subcultivos cuantitativos de los tubos o pozos para calcular la proporción del inóculo original - que ha sobrevivido.

Pruebas de susceptibilidad de difusión en agar.

En general, las pruebas de difusión en agar se llevan a cabo mediante la inoculación estandarizada de un medio de agar y aplicando la droga o drogas por estudiarse, sobre la superficie del agar en algún tipo de reservorio. Después de un período apropiado de incubación, puede existir una zona de inhibición - del crecimiento que puede medirse para determinar el grado de - susceptibilidad del organismo de prueba. Generalmente, cuando - las otras variables se mantienen constantes, el tamaño de la zona de inhibición refleja el grado de susceptibilidad de la cepa probada, dependiendo de las características de la droga en estudio.

Las soluciones de los agentes antimicrobianos que serán proba-- dos, deben aplicarse en la superficie del medio de agar inoculado en varias maneras diferentes.

1) Un método conveniente utiliza discos de papel filtro que han sido impregnados con las soluciones de la droga y se aplican directamente a la superficie del agar mientras que permanece húmedo. Los discos pueden ser sumergidos en la solución de la droga, pero de esta manera no puede predecirse la cantidad de la droga absorbida, puede usarse también una micropipeta para impregnar cada disco con un volumen medido de la solución de la droga, pudiendo calcularse entonces la potencia o contenido del disco.

Para facilitar el almacenamiento del papel filtro, puede secarse y guardarse en presencia de un desecante a temperaturas de congelación o menores.

2) Alternativamente, pueden aplicarse cilindros de metal o de vidrio a la superficie del medio de agar inoculado, para facilitar la aplicación de la solución de la droga, de tal manera que la columna de líquido esté en contacto directo con el agar.

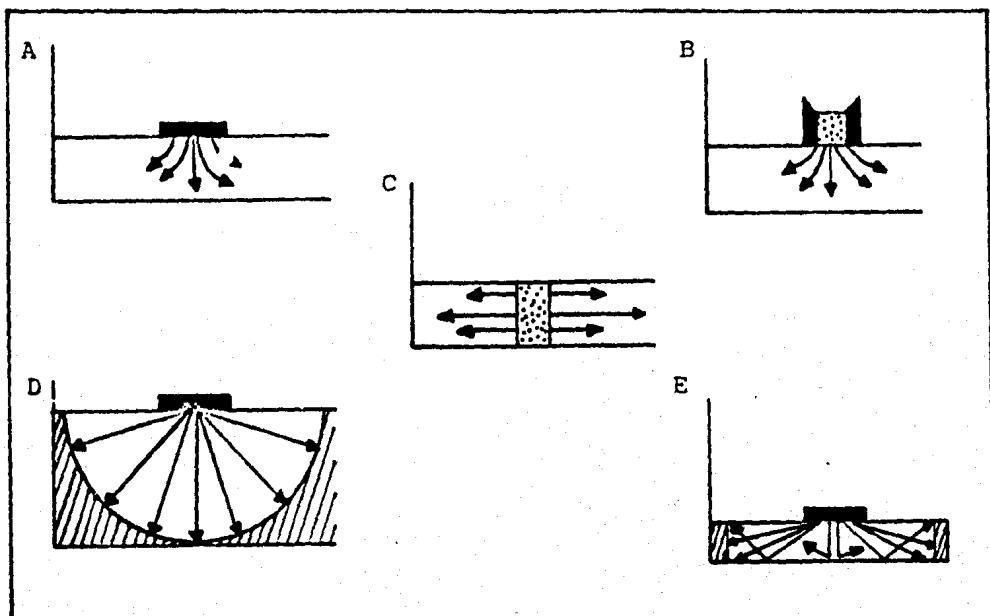
3) Finalmente, pueden cortarse cilindros del agar inoculado formando pozos usando un tubo hueco de 4 - 6 mm de diámetro y aplicando vacío. Los pozos formados se pueden llenar con las soluciones de la droga, en este caso, todas las drogas difunden generalmente en forma bidimensional.

Cuando la droga se aplica en discos de papel filtro seco, éstos absorben el agua del medio y la droga se disuelve y difunde en el medio adyacente. En la capa relativamente delgada de agar, la difusión descendente está bastante limitada y la concentración en el fondo del medio pronto alcanza una, cercana a la de la superficie, de allí en adelante la difusión continúa en forma esencialmente bidimensional. Debido a esto, la profundidad del agar es una variable de gran importancia en este procedimiento.

En una placa muy gruesa, la difusión tridimensional puede dar como resultado una zona de inhibición semicircular, siendo pequeña abajo y grande en la superficie. Cuando la droga se aplica a placas de agar muy delgadas, la droga disponible para difundir hacia afuera es mayor y, consecuentemente, la zona de inhibición tiende a ser mayor.

Fig. 9 Aplicación de los antimicrobianos a -
placas de agar inoculadas.

Los discos de papel filtro deben ser saturados
con la droga y aplicados en la superficie del
agar (A). Los cilindros de metal o vidrio de



ben aplicarse a la superficie del agar y lle--
narse con la solución de la droga (B). Deben
cortarse pozos del agar sembrado y llenados -
con la solución de la droga (C). En el últi--
mo caso la difusión es más cercana a ser bidi--
mensional. Cuando se aplican discos, la difu--
sión inicialmente es tridimensional (D), pe--
ro se vuelve bidimensional cuando la concentra--
ción del fondo alcanza la de la superficie. En
una capa muy delgada de agar, la difusión ha--

cia los lados es más rápida debido a que el equilibrio con el fondo del agar se alcanza rápidamente (E); consecuentemente, la zona de inhibición será mayor en las placas de agar delgadas.

Factores que influyen las pruebas de difusión.

Las variables más importantes que influyen las pruebas de susceptibilidad por difusión y que están sujetas a control experimental, son las siguientes:

1.- Densidad del inóculo. Esta es una variable que afecta el tamaño de la zona de inhibición, ya que la posición de ésta se determina cuando se obtiene la masa celular crítica. Se requiere más tiempo para alcanzar la masa celular crítica cuando el inóculo es pequeño y por lo tanto, la concentración crítica de la droga puede difundir más, resultando en grandes zonas de inhibición; mientras que inóculos muy grandes tienden a dar zonas de inhibición pequeñas.

Para las pruebas de susceptibilidad por difusión, un inóculo moderadamente denso, de cerca de 1×10^6 células viables por una caja de petri de 15 cm, es el que se recomienda generalmente.

2.- Profundidad del agar. Las placas de agar deben llenarse con una capa de aproximadamente 4 mm de espesor, variaciones mínimas en la profundidad del agar no afectan significativamente los resultados.

3.- Composición del medio de agar. El medio de agar por sí mismo puede influenciar el tamaño de las zonas de inhibición en

tres formas:

- a) Afectando la actividad de los diferentes antimicrobianos.
- b) Influenciando la velocidad de difusión del antimicrobiano.
- c) Afectando la velocidad de crecimiento del organismo de prueba.

La velocidad de difusión de la droga está determinada en cierto modo por la concentración del agar, la concentración de varios iones en el medio, el tamaño, la forma, la carga iónica de la droga y los grupos ionizados en el medio de agar, así como la viscosidad del medio y la temperatura de incubación.

4.- Temperatura de incubación. Normalmente la temperatura usada es de 35°C para el crecimiento óptimo de los patógenos humanos más comunes.

5.- Tiempo de incubación. Se ha estandarizado el tiempo de incubación a un período de toda la noche, definido normalmente entre 16 a 18 horas.

6.- Tiempo de aplicación de la droga. Algunos procedimientos de difusión requieren un período específico de predifusión a temperatura ambiente, luego de aplicar los discos, para proporcionar un tiempo adicional para que el antimicrobiano difunda a través del agar antes de que la masa celular crítica se alcance, por lo que el período de predifusión debe ser estandarizado cuidadosamente en los métodos utilizados.

7.- Concentración de antimicrobiano en el reservorio. En las pruebas de difusión, la cantidad de la droga es proporcional al tamaño de la zona de inhibición, pero afortunadamente, se requieren cambios bastante grandes en el contenido del disco para

efectuar un cambio mayor en los tamaños de las zonas de inhibición.

8.- Presencia de dos o más drogas en el reservorio. En general, el efecto sinérgico entre dos antimicrobianos no puede ser demostrado probando un solo disco que contenga las dos drogas, ya que la zona de inhibición sólo reflejará el efecto del antimicrobiano más activo en la combinación, sin que uno afecte la di fusión del otro.

Pruebas de susceptibilidad en disco.

El principio del método involucra el uso de una concentración constante de antibiótico impregnado en un disco de papel filtro seco, que se coloca sobre el agar empleado para cultivar al microorganismo en cuestión. La susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico, se indica por una clara zona de inhibición alrededor del disco de papel.

La aplicación de un disco de papel filtro impregnado con antibiótico en un agar inoculado, da como resultado el desarrollo de dos series de eventos simultáneos: 1) la difusión del antibiótico a través del gel de agar, produciendo un gradiente de concentraciones y, 2) el crecimiento del microorganismo.

La periferia de la zona de inhibición representa la concentración más baja del antibiótico que produce la inhibición del cre cimiento, relacionada con la densidad de células en este sitio, de esta manera, el borde de la zona de inhibición presenta una concentración del antimicrobiano similar a la CIM.

De todas las pruebas de difusión en agar, sólo la prueba reali-

zada con discos sigue empleándose debido a su accesibilidad comercial, así como a la facilidad de su realización.

Los discos de papel filtro deben ser certificados y, en caso de ser posible, es conveniente determinar la cantidad de antimicrobiano en el disco para tener parámetros de reproducibilidad de los resultados.

La selección de los antibióticos probados por este método, debe basarse en: a) la agrupación de éstos de acuerdo con su espectro, b) la elección de uno o dos de ellos como representantes de una familia, debido a la presencia común de resistencia cruzada dentro de una familia de antibióticos y, c) deben ser elegidos aquellos que son clínicamente útiles para la enfermedad de que se trate.

La lectura de los resultados se realiza determinando el diámetro de la zona de inhibición en mm, con una regla, mica calibrada, o un instrumento electrónico, pero siempre mediante técnicas estandarizadas. Los diámetros de las zonas de inhibición para los antibióticos individuales, se traducen en términos de susceptible o resistente de acuerdo a un cuadro interpretativo.

Pruebas alternativas con discos.

1.- Prueba de susceptibilidad directa con especímenes clínicos.

Se ha propuesto la inoculación directa de un espécimen clínico para disminuir el tiempo requerido para realizar la prueba de susceptibilidad; sin embargo, cuando el espécimen con tenga más de un tipo de microorganismo o cuando los miembros de la flora normal estén presentes, disminuirá la confiabilidad de

la prueba. La prueba directa puede, por lo tanto, ser elegida - sólo en casos clínicos urgentes, o bien cuando sea confirmada - con la prueba del microorganismo aislado.

2.- Prueba de susceptibilidad para bacterias con requerimientos nutricionales especiales.

Ciertas cepas patógenas comunes requieren un medio suplementado nutricionalmente para su crecimiento, en estos casos, - al medio de agar que se use se le pueden adicionar los suplementos en concentraciones específicas conocidas, o bien, probar este tipo de microorganismos con discos impregnados con las sustancias suplementarias.

Si el organismo requiere elementos nutricionales que afecten la actividad del antibiótico, el procedimiento de discos no debe usarse.

3.- Prueba de susceptibilidad rápida con discos.

El factor dominante que determina el tamaño de la zona de inhibición es el tiempo crítico, de manera que el crecimiento bacteriano que se obtiene más allá de una concentración específica de antibiótico, continuará independientemente de la difusión continua del antibiótico. Esto sugiere que las lecturas rápidas corresponderán a las que se obtengan tras de un tiempo prolongado de incubación. Se ha demostrado que las lecturas obtenidas luego de 5 a 8 horas de incubación son útiles, por lo que se consideran modificaciones a las pruebas estándar para lecturas tempranas.

4.- Prueba con combinaciones de antibióticos.

A este método se le ha denominado "método de los dos días

cos", ya que para llevarse a cabo se colocan dos o más discos a distancias predeterminadas (10 - 15 mm), con el objeto de demostrar ópticamente el efecto sinérgico o antagónico de los antibióticos, dependiendo de la forma de la zona de inhibición. El efecto sinérgico se demuestra por la ampliación de la zona de inhibición en relación con el disco con el antibiótico sinérgico, mientras que el efecto antagónico produce una reducción de la zona de inhibición respecto al disco con el antibiótico antagónico.

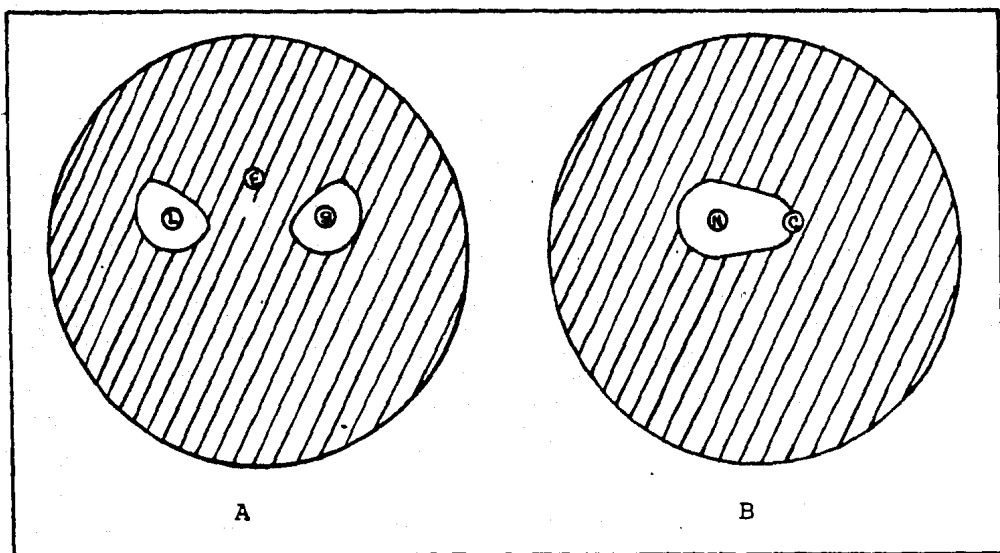


Fig. 10 Interacción entre antibióticos estudiados por la prueba con discos.

(A) Antagonismo. Eritromicina (E) vs. lincomicina (L) y espiramicina (S). Staphylococcus aureus resistente a la eritromicina. (B) Sinergismo. Colistina (C) - ácido nalidíxico (N), Proteus mirabilis resistente a la colistina.

Es importante aclarar que la fabricación de los discos impregnados con antibióticos está bajo el control de la Administración de Alimentos y Drogas (F.D.A.), para estandarizar la prueba.

Una modificación al método de Bauer-Kirby para la prueba de susceptibilidad con discos (la más usada) es la técnica de diseminación sobre una cubierta de agar, que pretende instalar el empleo de un inóculo uniforme por desarrollo del microorganismo prueba en pequeños volúmenes de caldo. En este método, de los cultivos primarios en agar se eligen de 4 a 5 colonias aisladas y se basan a un volumen pequeño de caldo nutritivo, se incuba a 35°C durante algunas horas y con un asa calibrada cargada con el cultivo en caldo, se inoculan tubos que contengan agar fundido y enfriado, se mezcla mediante rotación y el contenido se disemina sobre la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton; el procedimiento subsecuente se realiza como en el método de Bauer-Kirby.

Se han desarrollado también otros métodos rápidos en medio líquido, como son la microscopía directa que detecta cambios en las células bacterianas, los métodos nefelométricos rápidos de dilución en caldo y elución en disco (automatizados y semiautomatizados); los métodos que se basan en el uso de indicadores de pH, indicadores de óxido reducción y el control de la impedancia; otros métodos usados son los radiométricos, bioluminiscentes y microcalorimétricos, de los cuales, la mayoría no son utilizados como pruebas de susceptibilidad en el trabajo de referencia, dada su gran complejidad en algunos casos y, en otros, por el gran requerimiento de equipo y material no comúnmente usado en el laboratorio.

PARTE EXPERIMENTAL.

I.- Material.

157 cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de muestras clínicas provenientes de diferentes pacientes y de varias regiones - anatómicas (exudados varios).

Equipo.

Campana de luz ultravioleta.

Balanza analítica.

Espectrofotómetro.

Inoculador mecánico "Zapopler".

El material empleado comúnmente en el laboratorio de Bacteriología.

Medios de cultivo.

Gelosa sangre, agar de Mueller-Hinton, medios para pruebas bioquímicas (Kligler, SIM, Gelatina, Sorbitol, Rafinosa y Surra--co), medio de agar de Pseudomonas para la detección de fluoresceína, medio de agar de Pseudomonas para la detección de piocianina, caldo BHI.

Antimicrobianos.

Sales puras de 18 antimicrobianos, con potencia biológica conocida.

Amikacina grado industrial (905 mg/g).

Ampicilina sódica (971 mg/g).

Carbenicilina disódica (795 mg/g).

Cefalotina sódica (915 mg/g).

Clindamicina fosfato (776 mg/g).

Colimicina sulfato (658.5 mg/g).

Dibekacina sulfato (673.08 mg/g).

Dicloxacilina sódica (900 mg/g).

Eritromicina estolato (645 mg/g).

Fosfomicina disódica (752 mg/g).

Furazolidona (1000 mg/g).

Gentamicina base (583 mg/g).

Kanamicina sulfato (787 mg/g).

Lincomicina clorhidrato (813 mg/g).

Penicilina G sódica (987 mg/g).

Rifampicina normal (584 mg/g).

Sisomicina base (584 mg/g).

Tobramicina (920 mg/g).

Solventes y reactivos.

N,N-dimetil formamida.

Metanol absoluto.

Clorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina.

Glicerina.

Cloruro de bario.

Acido sulfúrico.

II.- Métodos.

A.- Identificación.

A pesar de que las cepas proporcionadas para este trabajo por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital General de México de la S.S.A.; fueron identificadas y aisladas en el medio de Kligler, se realizó una reidentificación de las mismas para confirmar la presencia de Pseudomonas aeruginosa en todos los casos.

La identificación de las cepas realizada en este trabajo se basó en los siguientes procedimientos:

1.- Pruebas bioquímicas.- Las pruebas bioquímicas comprendidas en el paquete de pruebas de identificación, fueron las siguientes: Kligler, SIM, Gelatina, Sorbitol, Rafinosa y Surraco.

El patrón de resultados para las cepas de Pseudomonas aeruginosa, como bacilo no fermentador típico, debía coincidir con el siguiente cuadro (6).

Kligler	Glucosa	negativo
	Lactosa	negativo
	Gas	negativo
	H ₂ S	negativo
SIM	Indol	negativo
	Movilidad	positivo
	H ₂ S	negativo

Gelatina		positivo o negativo (3)	
Sorbitol		negativo	
Rafinosa		negativo	
Surraco	}	Sacarosa	negativo
		Urea	negativo

2.- Pruebas de identificación de pigmentos en medios especiales.

Características de diferenciación de Pseudomonas fluorescentes de importancia médica (3).

Los números en paréntesis indican el por ciento de cepas positivas.

	<u>Ps. aeruginosa</u>	<u>Ps. fluorescens</u>	<u>Ps. putida</u>
Piocianina ^a	positivo (95)	negativo	negativo
Fluoresceína	positivo	positivo	positivo
Gelatinasa ^a	positivo (58)	positivo (100)	negativo (0)
Sacarosa	negativo	variable (52)	negativo (13)
Sorbitol	negativo	variable	negativo

a Reacciones de mayor importancia diagnóstica.

Se realizó la identificación de dos pigmentos producidos por las cepas de Pseudomonas aeruginosa (fluoresceína y piocianina), que nos permiten diferenciar a este microorganismo de otras Pseudomonas patógenas para el hombre como son, Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida, ya que aunque las tres especies producen el pigmento -

fluoresceína, sólo las cepas de Pseudomonas aeruginosa - son capaces de producir el pigmento piocianina, que constituye una característica importante de diferenciación de estas especies.

Procedimiento de la prueba de identificación de pigmentos.

Características morfológicas de Pseudomonas aeruginosa en medios de agar de diagnóstico.

Medio	Medio de agar de <u>Pseudomonas</u> para la detección de fluoresceína	Medio de agar de <u>Pseudomonas</u> para la detección de piocianina
Morfología colonial característica observada directamente	Generalmente incoloro a amarillento	Generalmente verdoso
Fluorescencia en luz U.V.	Amarillento	Azul

Se preparan los medios de agar de Pseudomonas para la detección de fluoresceína y piocianina, tal como se indica en el instructivo, se vierte en tubos de ensayo, se esteriliza y se espera a que el medio solidifique en forma inclinada, posteriormente se procede a la siembra de cada una de las cepas en los tubos respectivos para la identificación de fluoresceína y piocianina; se incubaba a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por no menos de tres días.

Luego de la incubación, se realiza el examen de las superficies estriadas bajo luz ultravioleta, con el objeto

de determinar si las colonias tienen las características descritas en el cuadro anterior (1).

3.- Prueba de las oxidasas.- Cualquier crecimiento colonial sospechoso en uno o más de los medios para Ps. aeruginosa, debe ser confirmado por medio de la prueba de las oxidasas (1).

Procedimiento de la prueba de las oxidasas.

Sobre el lugar del crecimiento colonial, se coloca una gota de solución acuosa al 1 % de clorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina recientemente preparada, si hay desarrollo de un color rosa que cambia a púrpura, el espécimen cumple los requerimientos de la prueba de presencia de Ps. aeruginosa (1).

El método se basa en que el microorganismo presenta un sistema citocromo-oxidasa, propio de algunas bacterias aerobias, que en presencia del oxígeno atmosférico, producen la oxidación del sustrato para formar un compuesto colorido, el indofenol.

B.- Pruebas de susceptibilidad de dilución en agar.

1.- Preparación de las diluciones del agente antimicrobiano.- La preparación de las diluciones se realiza tomando en cuenta las consideraciones mencionadas en las generalidades de las pruebas de susceptibilidad, basándose primordialmente en los valores hemáticos que los antimicrobianos alcanzarán en el paciente, para determinar -

el rango de las concentraciones de trabajo.

De este modo, las concentraciones empleadas en este estudio para los antimicrobianos, fueron las siguientes:

Antimicrobianos	Nivel hemático $\mu\text{g/ml}$		Concentraciones de trabajo $\mu\text{g/ml}$	
	máximo	mínimo	máxima	mínima
Amikacina	5.0	0.5	20.0	0.5
Ampicilina	8.0	0.5	20.0	0.5
Carbenicilina	50.0	5.0	50.0	0.5
Cefalotira	15.0	0.5	20.0	0.5
Clindamicina	5.0	0.5	5.0	0.5
Colimicina	5.0	0.5	5.0	0.5
Dibekacina	6.6	0.5	20.0	0.5
Dicloxacilina	5.0	0.5	20.0	0.5
Eritromicina	5.0	0.5	10.0	0.5
Fosfomicina	6.0	0.5	5.0	0.5
Furazolidona	50.0	5.0	50.0	0.5
Gentamicina	8.0	0.5	20.0	0.5
Kanamicina	2.0	0.5	20.0	0.5
Lincomicina	5.0	0.5	5.0	0.5
Penicilina	2.5	0.5	20.0	0.5
Rifampicina	5.0	0.5	10.0	0.5
Sisomicina	5.0	0.5	20.0	0.5
Tobramicina	5.0	0.5	20.0	0.5

La elección de estos rangos de concentraciones se realizó también de acuerdo a agrupaciones por familias de an-

tibióticos, con el fin de evitar el desarrollo de un esquema de dilución para cada antibiótico.

El procedimiento empleado para preparar las diluciones - consiste en pesar una cantidad del antibiótico equivalente a 10 mg por cada 10 ml de solvente, obteniendo de esta manera la solución madre que se utilizará en la elaboración de las diluciones subsecuentes.

Solventes empleados para la obtención de la solución madre.

Solvente	Antibióticos
Agua destilada estéril	Amikacina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, clindamicina, colimicina, dibekacina, dicloxacilina, fosfomicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, penicilina, sisomicina y tobramicina.
Metanol absoluto	Eritromicina y rifampicina.
N,N-dimetil formamida	Furazolidona.

En todos los casos, en las diluciones subsecuentes se emplea como solvente agua destilada estéril.

Se recomienda que la primera dilución o solución madre contenga una concentración de 1 mg/ml de antimicrobiano y que las diluciones subsecuentes se realicen de manera que la cantidad requerida de éstas por cada caja de petri, sea de 2 ml, que sumada al volumen de medio de agar de Mueller-Hinton (18 ml) por caja de petri, den un volumen final de 20 ml por placa. El procedimiento pa

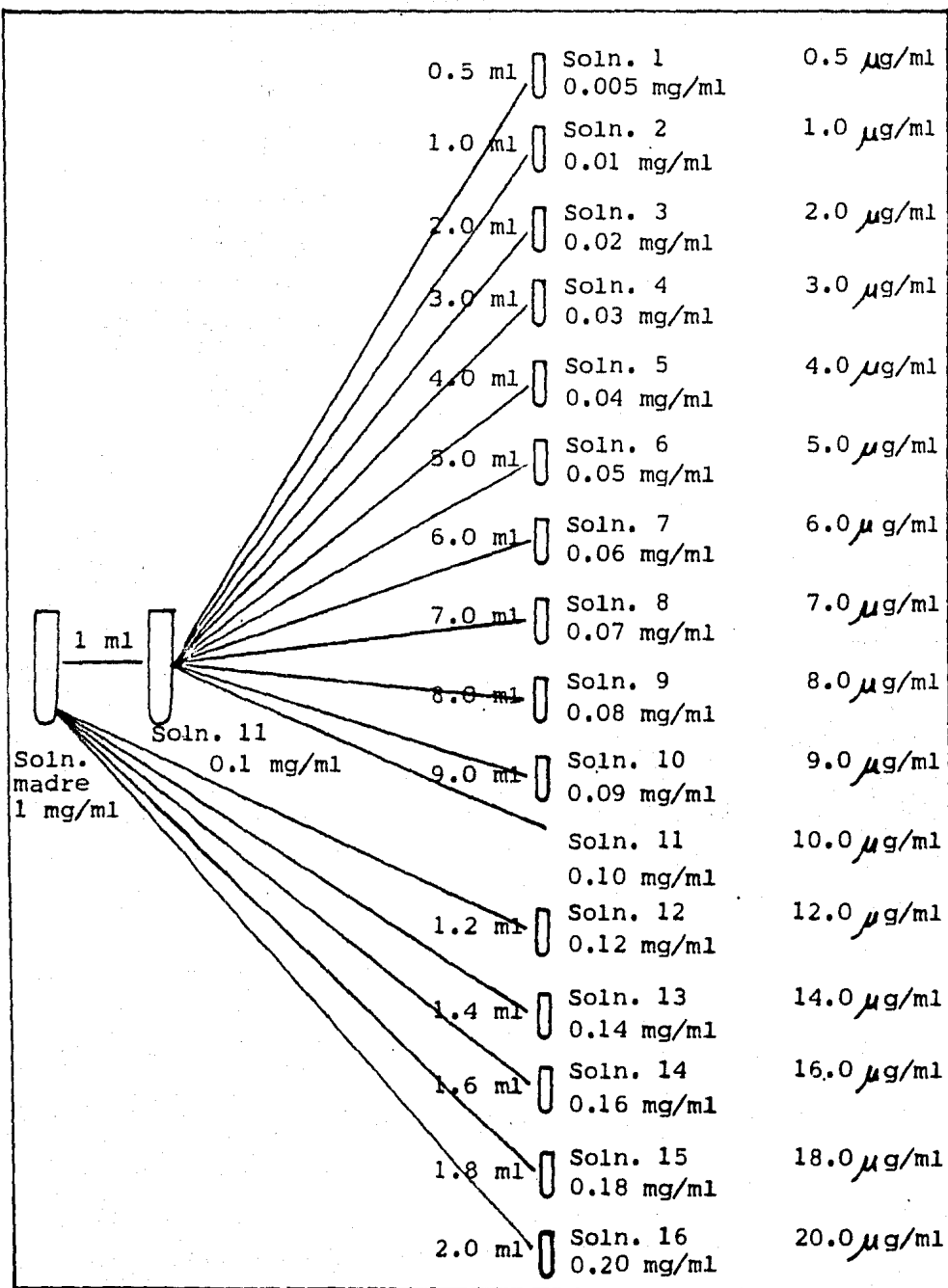
ra la obtención de las diferentes concentraciones de antimicrobianos empleadas en este estudio, se describen en los Esquemas 1 y 2 descritos a continuación.

2.- Preparación de las placas antimicrobianas.- El medio de agar de Mueller-Hinton se prepara tal como se indica en el instructivo, se esteriliza y se enfría a aproximadamente 50°C ; posteriormente, a 18 ml de medio licuado y enfriado, se le agregan 2 ml de la dilución del antibiótico respectiva (por placa antimicrobiana), luego de mezclarse perfectamente, se vierten 20 ml de esta dilución a cada una de las cajas de petri de 9 cm de diámetro, las placas se colocan en una superficie horizontal, y se dejan solidificar para posteriormente ser refrigeradas en bolsas de plástico, condiciones en las que pueden servir al menos durante una semana.

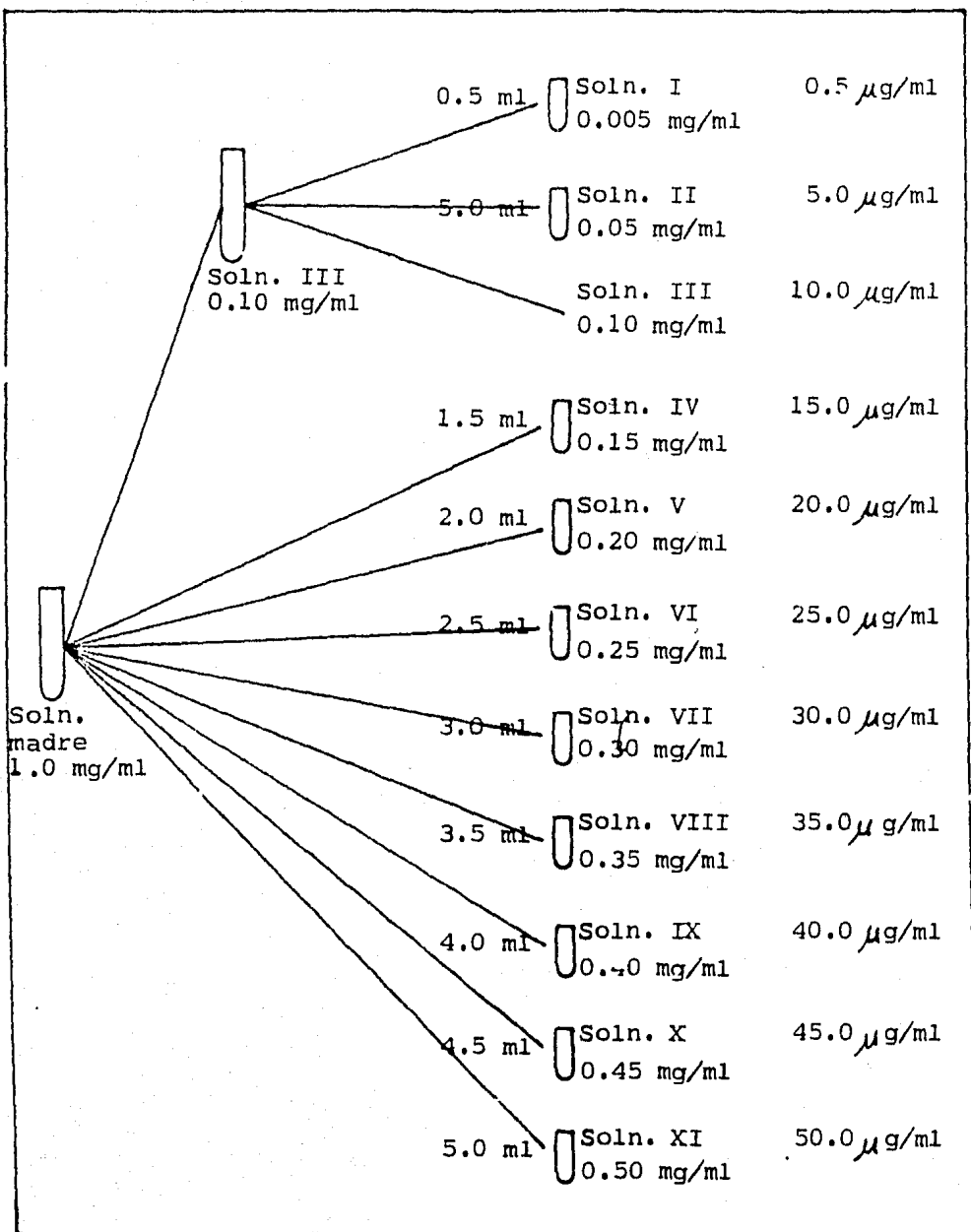
3.- Estandarización del inóculo.- Las colonias aisladas, se transfieren a 2 ml de caldo BHI, el cual se incuba durante 16 - 24 horas para obtener una turbidez suficiente. Ya que se ha obtenido un crecimiento activo en el caldo de cultivo, la turbidez se ajusta igualándola al estándar de BaSO_4 en el que se tiene una dilución 1:2 del estándar número 1 de McFarland, mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Este estándar de turbidez se prepara por adición de 0.5 ml de BaCl_2 0.048 M (1.175 % P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99.5 ml de H_2SO_4 0.35 N (1 % V/V).

Con el fin de determinar el por ciento de transmitancia



Esquema 1 Procedimiento de dilución para el rango de concentraciones de 0.5 a 20 $\mu\text{g/ml}$.



Esquema 2 Procedimiento de dilución para el rango de concentraciones de 0.5 a 50.0 $\mu\text{g/ml}$

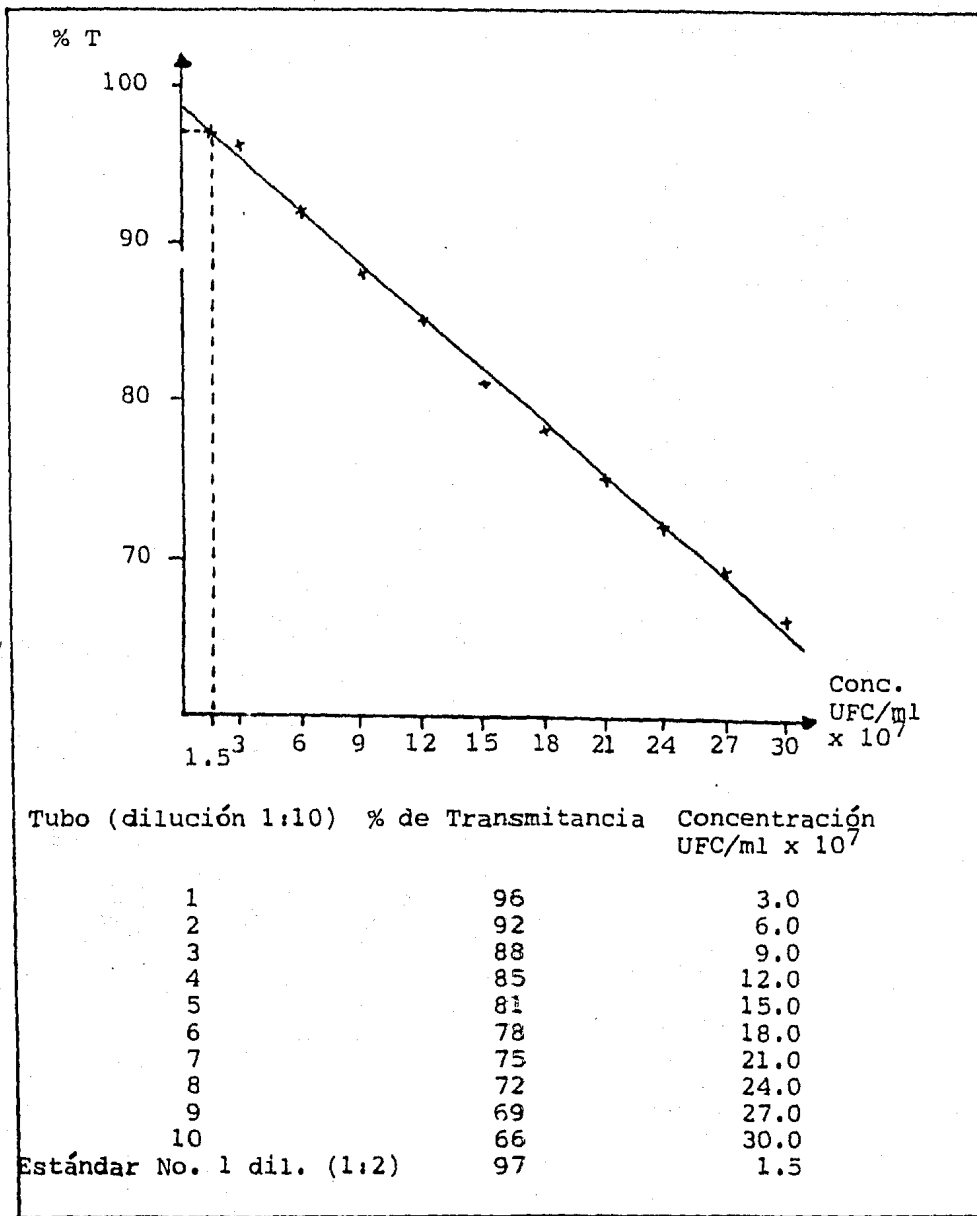
a la que debería de ajustarse el inóculo con el uso del espectrofotómetro, se realizó una curva con los estándares de McFarland, efectuando la preparación de éstos como se muestra a continuación.

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Acido sulfúrico (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad celular aprox. (x 10 ⁸ /ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

En la gráfica 1 se muestra la curva de los estándares de McFarland utilizada para este trabajo práctico.

Tomando en cuenta que el volumen administrado por sitio de inoculación es de 1 μ l, la estandarización del inóculo debe hacerse de modo que la suspensión de microorganismos de prueba cuente con 1.5×10^7 células viables (UFC)/ ml; es decir, el inóculo debe ajustarse a un % de Transmitancia de 97 ± 2 %.

4.- Inoculación de las placas.- La inoculación de las placas antimicrobiana y de una placa de control de crecimiento (preparada con 20 ml de agar de Mueller-Hinton sin antibiótico), se realiza mediante la ayuda de un inoculador mecánico "Zapopler", llenando los pozos de éste con el inóculo estandarizado a una densidad celular de 1.5×10^7 UFC/ml, de manera que el aparato servirá en cada sitio de inoculación 1.5×10^4 células viables



Gráfica 1 Curva de los estándares de McFarland.

(1 μ l) aproximadamente.

5.- Incubación de las placas.- La incubación se realiza a 35^oC durante 16 a 20 horas y posteriormente se procede a leer los resultados en términos de CIM.

6.- Lectura de los resultados.- La placa de control de crecimiento se observa con el fin de determinar si el medio permitió el crecimiento de las cepas estudiadas, así como para corroborar que la siembra de éstas se realizó adecuadamente, evitando la posibilidad de reportar resultados falsos.

La lectura se realiza mediante la determinación de la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, ignorando ligera opacidad del medio o bien una o dos colonias aisladas.

III.- Resultados.

A.- Corroboración de la identificación de las cepas.

Comportamiento de una cepa tipo de Ps. aeruginosa.

Pruebas bioquímicas	Kligler	Glucosa	negativo
		Lactosa	negativo
		Gas	negativo
		H ₂ S	negativo
	SIM	Indol	negativo
		Movilidad	positivo
		H ₂ S	negativo

Pruebas bioquímicas	}	Gelatina	variable*		
		Sorbitol	negativo		
		Rafinosa	negativo		
		Surraco	}	Sacarosa	negativo
				Urea	negativo
Producción de pigmentos	}	Fluoresceína	positivo		
		Piocianina	positivo		
Prueba de las oxidadas			positivo		

* El Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa menciona que las cepas de Ps. aeruginosa son gelatinasa positivas en una proporción mayor al 90 %; mientras que el autor Tom Bergan, menciona en el artículo Factores patogenéticos de Ps. aeruginosa - (3) que esta prueba puede ser utilizada como una característica de diferenciación entre Ps. aeruginosa y otras especies de Pseudomonas fluorescentes de importancia médica, y que el porcentaje de cepas de la primera que dan positiva la misma es de 58 %.

Las 157 cepas estudiadas coincidieron en un 100 % con los resultados arriba mencionados en relación con las pruebas bioquímicas, excepto en el caso de la prueba de la gelatina, en donde un 31.84 % de las cepas estudiadas resultaron ser gelatinasa negativas.

En lo que respecta a las pruebas de producción de pigmentos (fluoresceína y piocianina), todas las cepas presentaron posi

tividad.



En el caso de la prueba de las oxidasas, ésta resultó ser positiva en el 100 % de los casos.

B.- Pruebas de susceptibilidad.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad, que se realizaron en forma posterior a la identificación de las cepas, se muestran en las Tablas 1, 2 y 3 de resultados de las páginas siguientes.

Tabla 1 Resultados de las Pruebas de Susceptibilidad.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	20.0
Amikacina	4.5	15.9	25.5	40.1	51.4	61.8	66.2	70.1	71.3	75.8	82.2	83.4	86.6	89.2	90.5	93.6
Ampicilina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Cefalotina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Clindamicina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0										
Colimicina	0.0	0.0	10.8	21.0	44.0	54.8										
Dibekacina	3.8	10.2	28.0	38.9	48.4	52.2	62.4	63.7	64.3	65.0	65.0	65.0	67.5	68.8	68.8	68.8
Dicloxacilina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Eritromicina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6					

 Proporción de cepas susceptibles (grados)
 Proporción de cepas resistentes (grados)

 Nivel hemático máximo del antibiótico en dosis terapéuticas

No. Porcentaje acumulado de susceptibilidad

Tabla 2 Resultados de las Pruebas de Susceptibilidad.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	20.0
Fosfomicina	0.0	0.0	1.3	1.9	2.6	2.6	0									
Gentamicina	15.3	25.5	36.9	40.8	51.0	60.5	62.2	68.2	68.2 *	70.0	71.3	72.6	73.9	76.4	79.0	79.6
Kanamicina	5.1	8.9	13.4 *	14.7	15.9	16.6	17.8	17.8	19.8	19.8	20.4	20.4	21.0	21.7	22.3	22.3
Lincomicina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0									
Penicilina	0.0	0.0	0.0 *	0.0 *	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Rifampicina	3.2	7.0	7.6	9.6	10.2	10.8	20.4	23.6	25.5	26.1	30.6					
Sisomicina	7.0	14.0	23.6	29.3	36.9	49.7 *	53.5	56.0	58.0	58.6	58.6	59.2	59.9	60.5	60.5	61.2
Tobramicina	10.2	20.4	35.7	49.7	52.9	53.5 *	60.5	61.2	61.8	62.4	62.4	63.7	65.0	67.5	67.5	67.5

● Proporción de cepas susceptibles (grados)

○ Proporción de cepas resistentes (grados)

○ Nivel hemático máximo del antibiótico en dosis terapéuticas


No.


Porcentaje acumulado de susceptibilidad


Tabla 3 Resultados de las Pruebas de Susceptibilidad.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	0.5	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0	45.0	50.0
Carbenicilina	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	4.5	6.4	15.9	22.9	26.1	35.0 (*)
Furazolidona	0.0	1.9	1.9	1.9	1.9	3.2	7.0	16.6	19.1	41.4	82.8 (*)

 Proporción de cepas susceptibles (grados)

 Proporción de cepas resistentes (grados)

 Nivel hemático máximo del antibiótico en dosis terapéuticas

 Porcentaje acumulado de susceptibilidad

ANALISIS DE RESULTADOS.

A.- Identificación.

A través de los resultados obtenidos en la corroboración de la identidad de las cepas utilizadas en este estudio, puede verse que las 157 cepas que fueron proporcionadas para el desarrollo de este trabajo, previamente aisladas e identificadas a partir de exudados varios, pertenecen al género Pseudomonas especie aeruginosa, ya que todas las pruebas realizadas para la reidentificación de las mismas, coincidieron en un 100 % con el comportamiento de una cepa tipo teórica, quedando sólo por aclarar que la prueba bioquímica de la gelatina, que detecta la producción de la enzima gelatinasa, presentó cierta ambigüedad en los resultados debido al hecho de que, como se mencionó anteriormente, existen diferentes criterios para la interpretación de la misma; sin embargo, tomando como base el criterio de interpretación más reciente y habiéndose obtenido 68.16 % de positividad para la prueba de la gelatina, pueden identificarse sin lugar a dudas las 157 cepas empleadas, como cepas de Ps. aeruginosa.

B.- Pruebas de susceptibilidad.

1.- Amikacina.

La población de Ps. aeruginosa utilizada en este estudio, resultó poseedora de una muy alta susceptibilidad a la acción de la amikacina desde concentraciones relativamente bajas de la

droga, produciendo la inhibición del crecimiento de un gran porcentaje de cepas dentro de las concentraciones que coinciden con los niveles hemáticos de la droga en el humano.

2.- Ampicilina.

Este antibiótico resultó ser inefectivo en su acción contra Ps. aeruginosa, observándose una resistencia muy marcada de las cepas empleadas en el trabajo frente a la ampicilina, ya que se presentó únicamente una muy ligera susceptibilidad a concentraciones muy altas del antibiótico, localizadas en el límite de las concentraciones hemáticas que se obtienen en el organismo, en dosis terapéuticas.

3.- Cefalotina.

Las cepas de Ps. aeruginosa resultaron ser completamente resistentes a la acción de la cefalotina, aún a concentraciones mayores a los niveles hemáticos del antibiótico.

4.- Clindamicina.

No se observó susceptibilidad alguna de las cepas de Ps. aeruginosa frente a la clindamicina, en las concentraciones de trabajo.

5.- Colimicina.

La colimicina mostró una buena efectividad en su acción, inhibiendo el crecimiento de un gran número de cepas de Ps. aeruginosa en las concentraciones de trabajo, sobre todo en aquellas cercanas al nivel hemático máximo del antibiótico, cuando éste se aplica en dosis terapéuticas habituales.

6.- Dibekacina.

La dibekacina presentó efectividad en un gran número de

cepas de Ps. aeruginosa, inhibiendo el crecimiento desde concentraciones relativamente bajas de la droga y obteniendo, en las concentraciones más altas de trabajo, un porcentaje de susceptibilidad bastante importante.

7.- Dicloxacilina.

Las pruebas de susceptibilidad mostraron una resistencia absoluta por parte de Ps. aeruginosa frente a este antibiótico, dentro de las concentraciones de trabajo.

8.- Eritromicina.

Las cepas de Ps. aeruginosa mostraron una resistencia casi completa frente a la eritromicina, siendo evidente una ligera susceptibilidad a concentraciones altas de trabajo, que van más allá de los niveles hemáticos del antibiótico en dosis terapéuticas.

9.- Fosfomicina.

La resistencia de las cepas de Ps. aeruginosa frente a la fosfomicina fué muy marcada, de manera que la pequeña susceptibilidad observada en el rango de concentraciones que pueden alcanzarse en el organismo, es despreciable.

10.- Gentamicina.

La gentamicina resultó ser muy activa contra las cepas de Ps. aeruginosa, logrando un alto porcentaje de susceptibilidad a concentraciones comprendidas en el rango de los niveles hemáticos del antibiótico.

11.- Kanamicina.

La población de Ps. aeruginosa estudiada presentó una susceptibilidad moderada frente a la kanamicina a las concentra

ciones que pueden alcanzarse en la sangre; sin embargo, la resistencia puesta de manifiesto es bastante grande, por lo que es de mayor importancia que la susceptibilidad que pudo haber mostrado esta población frente a la kanamicina.

12.- Lincomicina.

La lincomicina resultó ser un antibiótico completamente inefectivo en su acción contra Ps. aeruginosa en las concentraciones de trabajo.

13.- Penicilina.

Las cepas de Ps. aeruginosa fueron 100 % resistentes a la acción de la penicilina en el rango de concentraciones empleadas en las pruebas de susceptibilidad.

14.- Rifampicina.

Este antibiótico presentó un poder inhibitorio mínimo del crecimiento de las cepas de Ps. aeruginosa en las concentraciones comprendidas dentro de los niveles hemáticos, por lo que su resistencia es el factor más importante a considerar.

15.- Sisomicina.

La sisomicina mostró un fuerte poder inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas de Ps. aeruginosa estudiadas, en las concentraciones comprendidas dentro de los niveles hemáticos.

16.- Tobramicina.

La población de Ps. aeruginosa exhibió una alta susceptibilidad frente a la tobramicina en concentraciones que coinciden con las concentraciones de la droga en la sangre.

17.- Carbenicilina.

La carbenicilina sólo presentó un efecto inhibitorio moderado sobre el crecimiento, en concentraciones muy cercanas a los límites más altos del antibiótico en el organismo.

18.- Furazolidona.

Las cepas de Ps. aeruginosa fueron muy susceptibles a la furazolidona en las concentraciones del antimicrobiano que corresponden al umbral máximo que puede obtenerse en el organismo, en dosis terapéuticas adecuadas.

En general, los antibióticos pertenecientes al grupo beta-lactámico, las penicilinas y las cefalosporinas, son inefectivos en su acción contra las cepas de Ps. aeruginosa, ya que como se ha mencionado anteriormente, la resistencia del microorganismo frente a este tipo de antibióticos es evidente, excepto en el caso de la carbenicilina, debido a las concentraciones he máticas tan altas de este antibiótico en el organismo.

Los antibióticos aminoglucósidos muestran una gran actividad inhibidora del crecimiento en contra de las cepas de Ps. aeruginosa, desde concentraciones muy bajas de éstos, haciéndose evidente un aumento gradual en la susceptibilidad del microorganismo a concentraciones mayores de las drogas, hasta alcanzar una proporción de susceptibilidad bastante importante en las concentraciones del antibiótico que corresponden al nivel máximo que puede obtenerse en el organismo cuando es administrado en dosis terapéuticas adecuadas, y aún más allá de estos ni-

veles; sin embargo, el aumento de la susceptibilidad del microorganismo a estas concentraciones no tiene aplicación práctica, debido a la gran toxicidad de estas drogas a concentraciones superiores a los niveles hemáticos antes mencionados.

La kanamicina es el único antibiótico aminoglucósido que exhibe poca efectividad en su acción contra la población de cepas de Ps. aeruginosa estudiada, ya que este antimicrobiano tiene un espectro de actividad muy limitado en relación con otros aminoglucósidos.

Los antibióticos pertenecientes al grupo de las lincominas, clindamicina y lincomicina, son totalmente inefectivos en su acción frente a Ps. aeruginosa.

CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

1.- Las drogas que mostraron un poder inhibitorio efectivo del crecimiento en concentraciones equivalentes a las que se alcanzan en la sangre cuando se administran en dosis terapéuticas fueron: amikacina, colimicina, dibekacina, gentamicina, sisomicina, tobramicina y furazolidona; por lo que estas drogas pueden considerarse como los antimicrobianos de elección en el tratamiento de las enfermedades causadas por Ps. aeruginosa, de acuerdo a la población estudiada.

2.- Los antibióticos kanamicina, rifampicina y carbenicilina presentaron únicamente un poder inhibitorio moderado del crecimiento, en las concentraciones correspondientes a los niveles hemáticos de dichos antibióticos en el organismo, por lo que no pueden considerarse más que como drogas de uso alternativo en la terapia contra las enfermedades causadas por Ps. aeruginosa.

3.- Los antibióticos restantes fueron inactivos frente a la población de cepas de Ps. aeruginosa estudiada; así, la ampicilina, eritromicina y fosfomicina presentaron únicamente un porcentaje casi despreciable de susceptibilidad por parte del microorganismo en estudio y sólo a concentraciones comprendidas en el límite máximo de los niveles hemáticos del antibiótico en el organismo o bien, aún a concentraciones mayores a éstos.

4.- Por otra parte, los antibióticos cefalotina, clindamicina, dicloxacilina, lincomicina y penicilina no mostraron efecto alguno sobre las 157 cepas de Ps. aeruginosa estudiadas, haciéndose evidente una resistencia absoluta del microorganismo hacia estas drogas; en base a lo anterior, el uso de estos antibióticos como medida terapéutica en las enfermedades debidas a Ps. aeruginosa, es completamente inoperante.

5.- Una identificación microbiológica certera de los agentes patógenos y la administración de agentes antimicrobianos apropiados en el tratamiento, son esenciales para obtener resultados óptimos y dejar de promover la existencia de fenómenos de resistencia.

6.- Las muestras biológicas de los pacientes debilitados u hospitalizados deben controlarse en forma seriada y continua durante el curso clínico de las enfermedades.

7.- Una prevención de las sobreinfecciones a través de una selección cuidadosa de la terapia antibiótica, un cuidado meticuloso de los aparatos empleados durante la terapia y la vigilancia del ambiente, pueden ejercer un impacto favorable en la lucha contra las enfermedades nosocomiales.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Authority of the U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.
U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XX, NF XV.
Ed. The U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.
United States of America.
pags. 875 - 877.
1980.
- 2.- Balows, A. Pruebas de Susceptibilidad a los Antibióticos.
Técnicas Actualizadas.
Ed. Médica Panamericana, S.A.
Buenos Aires.
pags. 13 - 70.
1976.
- 3.- Bergan, T. Pathogenetic Factors of Ps. aeruginosa. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 29: 7 - 12, 1981.
- 4.- Bevan, J. A. Essentials of Pharmacology. Introduction to the Principles of Drug Action.
Harper & Row, Publishers.
Hagerstown.
Second Edition.
pags. 400 - 487.
1976.
- 5.- Bidwell, J. L., D. S. Reeves. Resistance of Pseudomonas Species to Beta-Lactam Antibiotics. Scand. J. Infect. Dis. - Suppl. 29: 20 - 26, 1981.

- 6.- Buchanan, R. E., N. E. Gibbons. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
Ed. Board, The Williams & Wilkins Company.
Baltimore, U.S.A.
Eighth Edition.
pags. 217 - 222.
1974.
- 7.- Castro Luna, M. Dr., M. A. González Salayandía, M. Gutiérrez Dávila. Antibiograma de Dilución Seriada en Placa, Modificación al Método. Rev. Med. H.G.M., J.S.A. Vol. XLV - No. 11, 12: 371 - 373, 1982.
- 8.- Ciba. La Resistencia Bacteriana.
Producido por Ciba.
México, D. F.
pags 7 - 62.
- 9.- Davis, B. D.; R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, W. B. Jr. Wood, M. McCarty. Tratado de Microbiología.
Salvat Editores.
Barcelona, España.
Segunda Edición.
pags. 693 - 701, 808 - 810.
1978.
- 10.- Egoz, N.; D. Michaeli. A Program of Surveillance of Hospital-Acquired Infections in a General Hospital: A Two-Year Experience. Rev. Infect. Dis. 3: 649 - 657, 1981.
- 11.- Frøland, S. Infections with *Ps. aeruginosa* in the Compromised Host. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 29: 72 - 80, 1981.

- 12.- Garrod . Lambert . O'Grady. Antibiotic and Chemotherapy.
Churchil Livingstone Editors.
Edinburg, London and New York.
Fourth Edition.
pags. 42 - 220.
1973.
- 13.- Høiby, N.; A. Bremmelgaard, P. Schouenborg. In Vitro Acti-
vity of Azlocillin, Carbenicillin, Mezlocillin and Pipera-
cillin Against Ps. aeruginosa. Scand. J. Infect. Dis. -
Sup 1. 29: 27 - 30, 1981.
- 14.- Kagan, B. M. Antimicrobial Therapy.
Ed. W. B. Sanders Company.
Philadelphia, London, Toronto.
Second Edition.
pags. 3 - 126, 218 - 220.
1974.
- 15.- Kallings, L. O. Program for Surveillance and Intervention
in Specific Problem Areas of Nosocomial Infections. Rev. -
Infect. Dis. 3: 721 - 727, 1981.
- 16.- Kayser, F. H. Mecanismo de la Resistencia a los Quimioterá-
picos por parte de las Bacterias. Folia Chematherapeutica
3: 1 - 25, 1975.
- 17.- Kumin, C. M. Evaluation of Antibiotic Usage: A Comprehen-
sive Look at Alternative Approaches. Rev. Infect. Dis. 3: -
745 - 753, 1981.
- 18.- Lorian, V., M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine.
Ed. The Williams & Wilkins Company.

Baltimore, U.S.A.

First Edition.

pags. 1 - 204.

1980.

- 19.- Lowry, E. J. L. Control of Infection in the Hospital: Problems in Surgery and the Management of Burns. Rev. Infect. Dis. 3: 728 - 733, 1981.
- 20.- Malmborg, A. S., H. Alfredsson, E. Kusoffsky, B. Strandvik. Azlocillin and Gentamicin in Respiratory Tract Infections with Ps. aeruginosa in Patients with Cystic Fibrosis. - Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 29: 64 - 69, 1981.
- 21.- McGowan, J. E., Jr. Environmental Factors in Nosocomial Infection - A Selective Focus. Rev. Infect. Dis. 3: 760 - - 768, 1981.
- 22.- Meyers, I. H.; E. Jawetz, A. Goldfien. Manual de Farmacología Clínica.
Editorial El Manual Moderno, S. A.
México.
Segunda Edición.
pags. 577 - 623.
1975.
- 23.- Mitsuhashi, S. Drug Action and Drug Resistance in Bacteria.
2.- Aminoglycoside Antibiotics.
Published by University of Tokio Press.
Japan.
pags. 5 - 32.
1975.

- 24.- Norrby, R. Current Status of Pseudomonas Infections and Antibiotics. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 29: 81 - 86, 1981.
- 25.- Organización Mundial de la Salud. Vigilancia para Prevenir y Combatir los Riesgos Sanitarios Provocados por las Enterobacterias Resistentes a los Antibióticos. Serie de Informes Técnicos.
Publicado por la Organización Mundial de la Salud.
Ginebra.
pags. 1 - 59.
1978.
- 26.- Perea, E. J.; M. A. Torres, M. V. Borobio. Synergism of Fosfomycin - Ampicillin and Fosfomycin - Chloramphenicol Against Salmonella and Shigella. Antimicrob. Agents and Chem. Vol. 13, No. 5, 705 - 709, 1978.
- 27.- Pitton, J. S. Bases Genéticas y Bioquímicas de la Resistencia a los Agentes Antimicrobianos. Folia Chemotherapeutica 17: 1 - 10, 1978.
- 28.- Tager, I. B.; M. B. Ginsberg, E. Simchen, L. Miao, K. Holbrook, G. A. Faich. Rationale Methods for a Statewide Prospective Surveillance System for the Identification and Prevention of Nosocomial Infections. Rev. Infect. Dis. 3: 683 - 692, 1981.
- 29.- Terry, B. A. Preventing Nosocomial Infection Through the Use of Effective Management Techniques. Rev. Infect. Dis. 3: 738 - 741, 1981.
- 30.- Tood - Sanford. Davidsohn, I.; J. B. Henry. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio.

Salvat Editores, S.A.

España.

Sexta Edición.

pags. 1006 - 1009, 1036 - 1046.

1978.

- 31.- Wenzel, R. P.; Ch. A. Osterman, L. G. Donowitz, J. W. Hoyt, M. A. Saude, W. J. Martone, J. E. Jr. Peacock, J. I. Levine, G. B. Jr. Miller. Identification of Procedure - Related Nosocomial Infections in High - Risk Patients. Rev. - Infect. Dis. 3: 701 -707, 1981.
- 32.- Wretlind, B.; O. R. Pavlouskis. The Role of Proteases and Exotoxin A in the Pathogenicity of Ps. aeruginosa Infections. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 29: 13 - 19, 1981.