

206



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

*Determinación de la concentración bacte-
ricida y bacteriostática de gentamicina
sobre diferentes cepas bacterianas.*

TESIS MANCOMUNADA

*Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo*

P r e s e n t a n

*Ingrid Carolina Alvear Torres
Rosa Ortiz Pérez*



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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	1
GENERALIDADES	3
Antecedentes históricos.	4
Antibióticos.	8
Mecanismos de acción de los antibióticos.	9
Resistencia frente a los medicamentos.	14
Origen de la resistencia.	16
Antibióticos aminoglucósidos.	21
Gentamicina.	26
Antibióticos inhibidores del ribosoma.	34
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.	37
Principales características de los micro-organismos utilizados en este estudio.	40
PARTE EXPERIMENTAL	47
Material.	48
Medios de cultivo.	48
Reactivos.	49
Material biológico.	49
Toma de muestra.	50
Técnica de dilución en tubo.	57
RESULTADOS	61
DISCUSION	72
CONCLUSIONES	74
APENDICE	75
BIBLIOGRAFIA	77

INTRODUCCION

Los antibióticos son agentes quimioterapéuticos que se utilizan a nivel mundial, para el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano, teniendo algunos efecto bacteriostático y otros bactericida.

Una vez determinado el o los microorganismos patógenos, se puede elegir el antibiótico adecuado ya que estos pueden ser selectivos.

El uso inadecuado de las dosis de los antibióticos ha llevado a generar resistencia por parte de los microorganismos. Por esta razón es importante determinar in vitro la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de cada antibiótico sobre el agente infeccioso, ya que esto nos determina la cantidad que se debe administrar del mismo.

Para lo anteriormente mencionado se han realizado estudios de técnicas adecuadas para la determinación de dichas concentraciones, como son las técnicas de difusión en agar y la de dilución seriada.

La importancia de este trabajo reside en la determinación de la concentración bacteriostática y bactericida de gentamicina, antibiótico que actúa a nivel de síntesis de proteínas, en las cepas de Staphylococcus aureus y Escherichia coli que son los microorganismos

más comunmente aislados en infecciones de diferentes tipos de muestras como fueron; urocultivos, exudados faríngeos, exudado vaginal, espermocultivo, exudado nasal y coprocultivo, que constituyeron los estudios efectuados para la realización del trabajo de tesis. Dichos estudios se llevaron a cabo en el "Laboratorio Médico Providencia".

En las muestras trabajadas, en un número total de 108, se pueden observar las diferencias existentes en las concentraciones del antibiótico gentamicina tanto en la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) como en la CBM (Concentración Bactericida Mínima) de acuerdo al origen de la muestra, lo que probablemente nos indica la necesidad en primer término, de la realización del antibiograma para la administración del antibiótico y su concentración a dosis terapéutica.

GENERALIDADES

Antes del conocimiento de la etiología microbiana, las posibilidades de influir favorablemente sobre enfermedades infecciosas eran prácticamente nulas. Con los adelantos de la microbiología se dieron los primeros pasos para el control de las infecciones, así fué posible identificar a los microorganismos causales del padecimiento, se desarrollaron antisépticos y desinfectantes, se introdujo la asepsia en la cirugía, los guantes estériles, el autoclave, los filtros bacterianos y se inició el largo camino de las vacunaciones y la seroterapia. (33,43)

El descubrimiento y aislamiento de antimicrobianos, impusieron cambios importantes en la evolución de parásitos; pero los frutos de la quimioterapia habían sido limitados hasta 1935. Toda la confianza se había depositado en la manipulación inmunológica y las enfermedades bacterianas o virales podían ser tratadas o prevenidas con el uso de vacunas o sueros específicos. (32)

Con todo y ser muy importantes las contribuciones de las vacunas, las tasas de mortalidad y morbilidad eran muy altas. Algunas de las enfermedades más graves eran: neumonía lobar, tuberculosis, rickettsiasis, meningitis, enfermedades venéreas, septicemias, fiebre tifoidea y endocarditis.

Tal situación no era producto de la ignorancia, se conocían casi todos los agentes causales, se habían preparado cultivos puros, era posible obtener sueros antiespecie y una infinidad de vacunas. El conocimiento de los mecanismos patogénicos y las vías de contaminación, parecían conocimientos poco prácticos frente a las necesidades terapéuticas. La preocupación era general, y el nacimiento de los institutos de investigación a finales del siglo pasado y principios del presente obedecieron al interés por las enfermedades.

Antecedentes históricos

La secuencia de los acontecimientos no fué inesperada ni ilógica, hubo necesidad de conocimiento básico, de tecnología apropiada y de conceptos fundamentales en el mecanismo de las bacterias, en la ecología de las floras microbianas y en la toxicidad selectiva, para que pudiera contarse con antimicrobianos eficaces.

El trabajo publicado por Domagk en 1935, constituyó el nacimiento de la quimioterapia moderna. Las contribuciones de Ehrlich, fueron la base del desarrollo que dio origen a la síntesis de sustancias con acción antimicrobiana. (16,32,33,43)

La demostración del efecto antibacteriano de las sulfonamidas resultó excepcional no sólo por el núme

ro de infecciones modificadas sino por la calidad de las respuestas clínicas. (16,33,43)

Pasteur y Joubert desde 1877 reconocieron la posibilidad de emplear bacterias en la terapéutica de las infecciones y demostraron el antagonismo que existe entre Bacillus anthracis y bacterias no patógenas. (33, 43)

Tyndall en 1881 descubrió un hongo del género Penicillium, que al ser adicionado a soluciones turbias por el crecimiento bacteriano las transformaba en transparentes; otros microbiólogos observaron el mismo fenómeno, pero nadie pensó que pudiera tener las consecuencias conocidas hasta nuestros días.

Vuillemin en 1889, incluyó los términos ANTI-BIOSIS o ANTIBIOTE, definiéndoles de la siguiente manera; "una criatura destruye la vida de otra para su supervivencia, siendo la primera plenamente activa y la segunda enteramente pasiva; una está en posición irrestricta frente a la vida de la otra". Para Waksman el término ANTIBIOTICO se aplica a "aquellas sustancias químicas de origen microbiano que en pequeñas cantidades ejercen actividad antimicrobiana. (33,43)

Hasta 1890 el tratamiento realizado con extractos y hongos no tuvo éxito y la falta de reproducibilidad hizo que se abandonara esta terapia. El descubrimien

to de Fleming en 1929 del efecto antimicrobiano de la penicilina sobre el estafilococo dorado pasó desapercibido durante 10 años. El conflicto bélico de 1939 a 1945 fué motivo para desarrollar, en escala nunca vista, la producción de la penicilina y la prueba de sus efectos antimicrobianos y después producirla industrialmente. (16,43)

El descubrimiento de la penicilina planteó muchas preguntas como por ejemplo el porqué bacterias patógenas como Vibrio cholerae o Salmonella no desarrollaban en el suelo, y cómo descubrir nuevos antibióticos. La respuesta de Waksman fue que la desaparición de las bacterias patógenas en el suelo se debía a la acción antagonista de otros microorganismos. Selman Rutgers fue quien tuvo la idea de buscar en el suelo productos antibacterianos; entre 10,000 cultivos de microorganismos procariones del suelo, llegó al descubrimiento de la estreptomicina, no cambiando la técnica original para la obtención de antibióticos utilizada hasta la fecha. (33)

En el reino vegetal también se conocen numerosas sustancias que, generadas por las plantas, evitan el crecimiento de todo ser vivo en cierto perímetro a su alrededor.

En la flora del ser humano, la producción de antibióticos como la piocianina de Pseudomonas aeruginosa, microccina y colicina de Escherichia coli y marces-

cinas de Serratia marcescens, inhiben el desarrollo de otras bacterias y son parte fundamental de la flora microbiana. (32,33)

La manipulación química de las estructuras naturales se inició con la producción del ácido 6-aminopenicilánico que se utiliza para la semisíntesis de varias penicilinas.

Los resultados obtenidos con el antibiótico han sido asombrosos y han sobrepasado lo encontrado con las sulfonamidas. Muchas enfermedades se controlan por el empleo adecuado de antibióticos y quimioterapéuticos, algunas persisten largo tiempo antes de encontrarse los agentes eficaces.

Una consecuencia no prevista fue el diagnóstico de las inmunodeficiencias, antes de la disponibilidad de antimicrobianos eficientes, las enfermedades en lactantes, como septicemia, bronconeumonía y meningitis, daban margen para la sobrevivencia o la muerte, asociadas con tal condición, la inmunidad desarrollada dejaba protección ante ulteriores exposiciones sin extrañar dicha condición. (33)

Antibióticos

Los antibióticos son agentes quimioterapéuticos procedentes del metabolismo de animales y vegetales, principalmente hongos microscópicos y bacterias, que ejercen acción inhibitoria sobre microorganismos parásitos llegando incluso a destruirlos.

Propiedades de un antibiótico ideal:

Para que un antibiótico sea considerado como adecuado o ideal como agente quimioterapéutico debe reunir las siguientes cualidades:

1) Será capaz de destruir o inhibir muchas especies de microorganismos patógenos.

2) Deberá evitar la aparición de formas resistentes del microorganismo.

3) No deberá producir efectos secundarios indeseables, como reacciones de hipersensibilidad o alergias, lesión en el sistema nervioso o irritación de los sistemas renal y gastrointestinal.

4) No deberá modificar o suprimir la flora microbiana habitual del huésped, para no alterar el equilibrio de la naturaleza, ni permitir que los microorganismos no patógenos normalmente, o las formas patógenas reprimidas por la flora habitual, establezcan una nueva infección. (17,28,43)

5) Deberá absorberse con facilidad en el organismo. (14)

6) Deberá ser activo en presencia de líquidos tisulares y corporales esencialmente en la sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y bilis. (17)

7) Deberá tener una estructura estable, pero metabolizable por el organismo humano. (14,17,43)

8) Cualquier droga que sea utilizada en el cuerpo deberá ser de toxicidad selectiva, que sea tóxica al microorganismo y no al huésped. Muchos agentes quimio terapéuticos tienen un grado de toxicidad que interfiere con el metabolismo del huésped. (13)

Mecanismo de acción de los antibióticos

La célula inhibida por un antibiótico está en estado dinámico. La interacción entre un antibiótico y su sitio de unión específico en una célula sensible, pone a funcionar una cadena de reacciones que finalmente llevan a la inhibición del desarrollo normal, de la división celular y frecuentemente termina en una completa autólisis de la célula. (40)

La actividad antibacteriana (13,32,40,43) de los antibióticos, se pone de manifiesto por su capacidad de afectar el metabolismo bacteriano en las cuatro formas siguientes:

1) Inhibición de la síntesis de la pared celular.

La pared celular bacteriana está formada por el péptidoglucano o mureína, que consta de unidades peptídicas y de azúcares. En el péptidoglucano, las cadenas lineales polisacáridas están unidas entrecruzadas por péptidos cortos. El péptidoglucano consta de tres unidades: (1) un disacárido de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico en enlace B-1, 4-glucosídico; (2) un tetrapéptido de L-alanina, D-glutamina, L-lisina y D-alanina y (3) un puente peptídico de pentaglicina. La envoltura de péptidoglucano es más gruesa en la pared celular de las bacterias Gram positivas que en la de las Gram negativas. (32,34,40,47)

La penicilina, sus derivados, y todas las cefalosporinas, son inhibidores selectivos de la síntesis de la pared celular, mediante el bloqueo del eslabonamiento entrecruzado de los glucopéptidos lineales o sea que es una reacción de transpeptidación. Una vez que el medicamento se ha adherido a los receptores celulares, se inhibe la reacción de transpeptidación y se bloquea la síntesis de péptidoglucanos. Como consecuencia, se inhibe la formación de la pared celular. Esto implica que las células sensibles cultivadas en presencia de penicilina presentan formas grotescas filiformes. (32,40,47)

La inhibición de las enzimas de la reacción de

transpeptidación por las penicilinas y cefalosporinas, puede deberse a la semejanza en las estructuras de estos medicamentos con la acil-D-alanil-D-alanina. La reacción de transpeptidación implica la pérdida de una D-alanina del pentapéptido. (32,40,47)

La ausencia de toxicidad de las penicilinas para las células de los mamíferos debe atribuirse a la ausencia de pared celular con péptidoglucano en las células animales. La resistencia a las penicilinas está, en parte, determinada por la producción de la enzima beta-lactamasa por el microorganismo que destruye la penicilina. La beta-lactamasa abre el anillo beta-lactámico de la penicilina suprimiendo la actividad antimicrobiana. (32)

2) Alteración de la permeabilidad de la membrana.

La membrana actúa como barrera, previniendo la libre difusión entre el medio ambiente interno y externo y manteniendo una presión osmótica en equilibrio. Esta membrana se considera como el sitio específico de las proteínas (permeasas) las cuales controlan el transporte activo de aminoácidos y azúcares dentro de la célula, así mismo es el sitio del transporte de electrones. La membrana bacteriana posee una estructura compleja conteniendo una alta proporción de fosfolípidos y proteínas junto con algunos carbohidratos.

Es determinante que la desorganización de esta estructura puede ser letal para la célula. (32,40,47)

Algunos antibióticos, especialmente los polienos, debilitan la membrana celular y dejan escapar el contenido celular. Las polimixinas se combinan con la membrana celular y son causa de la desorientación en las lipoproteínas e impiden que éstas funcionen como barrera osmótica. (13,32,40,43)

3) Inhibición de la síntesis de proteínas.

Las bacterias tienen ribosomas 70S, las células de los mamíferos poseen ribosomas 80S. Las subunidades de cada tipo de ribosomas y sus especificidades funcionales son lo suficientemente diferentes para poder explicar porqué los antimicrobianos pueden inhibir la síntesis proteica en los ribosomas de las bacterias, sin tener mayor efecto sobre los ribosomas de las células de los mamíferos. (32)

El modo de acción de los aminoglucósidos se efectúa de la manera siguiente:

La primera etapa es la inserción del aminoglucósido a una proteína receptora especial (P10 en el caso de la estreptomina) sobre la subunidad 30S del ribosoma microbiano. En la segunda, el aminoglucósido bloquea la actividad normal del complejo de iniciación de la formación del péptido ($ARN_m + \text{formilmetionina} + ARN_t$).

Tercera, el mensaje del ARN_m es leído mal sobre la región de reconocimiento del ribosoma y como resultado, se inserta el aminoácido equivocado en el interior del péptido produciéndose una proteína no funcional. Cuarta, la inserción del aminoglucósido resulta en la destrucción de los polisomas en su separación en "monosomas", incapaces de efectuar la síntesis proteica. Estas actividades ocurren más o menos simultáneamente y el efecto global es irreversible, destruye a la célula bacteriana. (30,32,34,40,41,47)

4) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

Los medicamentos como la actinomicina (32,40,43 47), son los inhibidores complejos de la síntesis de ADN ligándose a los residuos de dextrosiguanosina. El complejo ADN-actinomicina inhibe a la ARN-polimerasa dependiente del ARN y bloquea la formación del ARN_m, inhibe también la replicación del ADN de los virus.

Las mitomicinas producen el primer enlace cruzado de las complementarias de ADN y subsiguientemente bloquean la replicación del ADN. La rifampicina inhibe el desarrollo bacteriano enlazándose intensamente a la ARN-polimerasa dependiente del ADN bacteriano inhibiéndose así la síntesis de ARN. (32,40,43)

Resistencia frente a los antimicrobianos

El hecho de que las células bacterianas puedan llegar a hacerse resistentes a los antibióticos por mutación, implica que la supresión o modificación de una enzima, o la alteración de las propiedades de algún otro componente celular cuya síntesis esté bajo control, puedan ser responsables de la respuesta alterada del fármaco. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales los microorganismos podrían exhibir resistencia a los medicamentos (27), se enlistan a continuación:

1) Los microorganismos cambian su permeabilidad al medicamento. Ejemplo: la resistencia a la amikacina y algunos otros aminoglucósidos puede depender de la falta de permeabilidad a los medicamentos, al parecer debido a la alteración del transporte activo a través de la membrana. (32,43)

2) Los microorganismos producen enzimas que destruyen al medicamento activo. Ejemplo: las bacterias Gram negativas resistentes a los aminoglucósidos (debido a los plásmidos) producen enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que destruyen al medicamento. Los estafilococos resistentes a la penicilina G producen una beta-lactamasa que destruyen al medicamento, hidrolizándolo. (3,8,9,20,21)

3) Los microorganismos desarrollan un blanco estructural alterado para el medicamento. Ejemplo: la resistencia cromosómica a los aminoglucósidos está asociada con la pérdida o alteración de alguna proteína específica sobre la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, el cual sirve como sitio eslabonante en microorganismos susceptibles. (8,22,32,43)

4) Formación de una vía metabólica alterna que soslaya alguna reacción que es la que normalmente inhibe al agente. Ejemplo: algunas bacterias resistentes a las sulfonamidas no requieren ácido p-aminobenzoico (PABA) extracelular, sino que, a semejanza de las células de los mamíferos, pueden utilizar el ácido fólico preformado. (27,43)

5) Inhibición competitiva entre el metabolito esencial y un análogo metabólico (agente antimicrobiano) Ejemplo: la acción selectiva de las sulfonamidas se explica por el hecho de que la molécula de PABA y la molécula de sulfonamida son tan similares, que la sulfonamida puede entrar en la reacción en lugar del PABA y bloquear la síntesis de un constituyente celular esencial, que en este caso es el ácido fólico. (27,43)

Origen de la resistencia a los antimicrobianos

Para la mayoría de las acciones de los medicamentos antibacterianos, se requiere la replicación activa de las bacterias. Por consiguiente, los microorganismos que están inactivados en su metabolismo (no se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento) presentan características fenotípicas resistentes al medicamento. No obstante, sus descendientes son totalmente susceptibles.

Otra forma es que los microorganismos pueden perder la estructura de blanco específico para algún medicamento durante varias generaciones y volverse en esta forma resistente (32,49), ejemplo: las bacterias susceptibles a la penicilina pueden transformarse en formas L durante la administración de penicilina, careciendo de la mayor parte de la pared celular, por lo que se vuelven resistentes a los medicamentos que actúan por este mecanismo inhibitorio del desarrollo de la pared celular (penicilinas, cefalosporinas) y pueden permanecer así durante varias generaciones como resistentes. Cuando estos microorganismos regresan a sus formas bacterianas originales reanudando su producción de pared celular, se vuelven nuevamente susceptibles por completo a la penicilina (23,32)

La mayoría de los microorganismos resistentes a los antibióticos se han presentado como resultado de cambios genéticos y procesos de selección subsiguiente. Los cambios genéticos pueden ser cromosómicos o extracromosómicos y ser transferidos de una especie de bacterias a otra por toda una gama de mecanismos. (8,32)

El material genético de las bacterias es formado por una molécula de ADN circular de doble cadena, superenrollado y plegado dentro de la célula. Se replica en forma semiconservativa y bidireccional.

I) Resistencia cromosómica

Esta se desarrolla como resultante de la mutación espontánea en un locus genético que controla la sugceptibilidad o resistencia. Las mutantes espontáneas, que difieren genéticamente de la población original, en que ya son resistentes a la acción del fármaco, sobreviven y dan lugar a una población completamente nueva, resistente al fármaco.

El fármaco proporciona una presión selectiva muy fuerte en favor de las células resistentes, al evitar el crecimiento de todas las células originales sensibles no mutantes. Este tipo de resistencia aparece por alteración mutacional de un componente celular, esto es

muy común en un mismo paciente. Ejemplo; la proteína P10 que se encuentra en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano sirve como receptor para la inserción de la estreptomina. La mutación en el gen que controla la proteína estructural da como resultado la resistencia a la estreptomina. Una estrecha región del cromosoma bacteriano contiene genes estructurales que fijan numerosos receptores de medicamentos, incluyendo aquéllos para la eritromicina, lincomicina, aminoglucósidos, etcétera. (8,27,32)

II) Resistencia extracromosomal

Análisis genéticos han demostrado que la mayoría de las bacterias patógenas aisladas poseen un elemento extracromosomal llamado plásmido. Los plásmidos son moléculas de ADN circular, tienen 1-3% del peso del cromosoma bacteriano, pueden existir libres en el citoplasma bacteriano o pueden estar en ocasiones integrados en el interior del cromosoma bacteriano. Algunos plásmidos portan sus propios genes para la replicación y la transferencia. Otros dependen de los genes de otros plásmidos (32,43)

Los factores de resistencia (R) constituyen una clase de plásmidos que portan genes que demuestran resistencia específica para una variedad de antibióticos y

otras sustancias antibacterianas. Los genes del plásmido para la resistencia de los microorganismos controlan a menudo la formación de enzimas capaces de destruir a los medicamentos antibacterianos. Los plásmidos transfieren las enzimas que destruyen al cloramfenicol (acetiltransferasas); las enzimas que acetilan, adenililan o fosforilan diversos aminoglucósidos y las enzimas que determinan el transporte activo de las tetraciclinas a través de la membrana celular, y otros medicamentos. (8,19,22, 23,11)

El material genético y los plásmidos pueden ser transferidos mediante los siguientes mecanismos:

1) Transducción

El plásmido es clonado en un virus bacteriano y transferido por el virus a otra bacteria de la misma especie. Ejemplo: el plásmido porta el gen para la producción de beta-lactamasa que puede transferirse de un estafilococo resistente a la penicilina por algún bacteriófago, a otro que sea susceptible al medicamento. (13, 32,43)

2) Transformación

El ADN desnudo pasa de una célula a otra, alterando su genotipo. Esto puede ocurrir espontáneamente, o través de la técnica de recombinación del ADN.

3) Conjugación bacteriana

La transferencia de material genético de una célula a otra requiere un contacto real entre las bacterias que se aparean. Esta transferencia es mediada por el factor de fertilidad (F) que resulta de la proximación de los pelos sexuales de la célula donadora (F^+) al receptor. El plásmido o algún otro ADN se transfiere a través de estos túbulos de proteína del donador al receptor. Una serie de genes estrechamente ligados, determinan cada uno la resistencia a un medicamento, pudiendo entonces transferirse de una bacteria resistente a una susceptible. El factor de transferencia de resistencia (FTR) constituye la forma más común de diseminación de la resistencia a múltiples medicamentos entre diversos géneros de bacterias Gram negativas. (13,32,43)

4) Transposición

La transferencia de secuencias cortas de ADN (transposiciones, elementos transposables) ocurre entre un plásmido y una porción del cromosoma bacteriano dentro de alguna célula bacteriana. (32)

Antibióticos aminoglucósidos

En la naturaleza, los azúcares y aminoglucósidos están ampliamente difundidos como elementos moleculares en forma libre o conjugada. Es por eso que no es extraño aislarlos también como elementos constitutivos de antibióticos, por ejemplo: los aminociclitolos.

Todos los antibióticos aminoglucósidos se distinguen por su estructura tri o tetrasacárida sin formación de cadenas laterales mayores. Un componente común de la molécula de aminoglucósidos es la estreptamina y sus derivados, particularmente la 2-deoxiestreptamina.

Por medio del enlace de distintos azúcares naturales que existen en forma de anillos, a través de grupos hidroxilo, se obtienen glucósidos de diversas características. (38,49)

Los antibióticos aminoglucósidos se clasifican (8,49) según los azúcares constituyentes, en los siguientes grupos (sólo de interés clínico):

- I) Contienen estreptamina;
Estreptamina y sus derivados.
- II) Contienen deoxiestreptamina:
 - a) los sustituyentes están en hidroxilos adyacentes; neomicinas, paromicinas, hibrimicinas y lividomicinas.

b) los sustituyentes están en hidroxilos no adyacentes;

i) Kanamicina, amikacina, dibekacina.

ii) Nebramicinas; gentamicina, tobramicina, sisomicina y metilmicina.

III) Aminociclitoles; espectinomycinina.

Los aminoglucósidos poseen el fenómeno de resistencia bacteriana, en el que bruscamente una cepa sensible se torna resistente. La resistencia presentada por los microorganismos hacia los aminoglucósidos se encuentra determinada por ciertos mecanismos como son aquéllos que presentan:

a) Inactivación enzimática.

b) Alteración en algún sitio específico.

c) Presencia de factores de resistencia (R).

d) Alteración de la permeabilidad de la membrana.

a) Inactivación enzimática.

El mecanismo radica en la biosíntesis de enzimas bacterianas capaces de inactivar a los aminoglucósidos a través de reacciones que modifican grupos hidroxilo y amino, críticos para la acción antimicrobiana, por la introducción de grupos bloqueadores que puedan ser de tres clases; acetilo, fosfato y adenilo, mediante reacciones de acetilación, fosforilación y adenilación. (8,10,48,49)

La posición de los grupos hidroxilo y amino varía según los aminoglucósidos; pero una enzima puede inactivar varios aminoglucósidos si el grupo bloqueado es importante en el efecto del antibiótico. Las enzimas responsables de la inactivación son producidas por segmentos de ADN originados por plásmidos R, casi siempre en el espacio del citoplasma siendo de naturaleza constitutiva. (20,21)

Davies y colaboradores (22) describieron en 1977, las características de las enzimas activantes de aminoglucósidos (tabla 1).

Tabla 1: Enzimas determinadas por plásmidos que inactivan a los aminoglucósidos

ENZIMA	SUSTRATO
3'-O-fosfotransferasa	Neomicina, kanamicina.
3''-O-fosfotransferasa	Estreptomocina.
2''-O-fosfotransferasa	Gentamicina.
2''-O-adenililtransferasa	Gentamicina, tobramicina.
4'-O-adenililtransferasa	Amikacina, tobramicina.
3''-adenililtransferasa	Estreptomocina, espectinomocina.
6'-O-adenililtransferasa	Estreptomocina.
6'-N-acetiltransferasa	Amikacina, tobramicina.
2'-N-acetiltransferasa	Gentamicina, tobramicina.
3'-N-acetiltransferasa	Gentamicina, tobramicina.

b) Alteración en algún sitio específico.

Existe también evidencia que los antibióticos aminoglucósidos ejercen su efecto antimicrobiano debido a que ocasionan una inhibición irreversible en la síntesis de proteínas en aquellas células sensibles o susceptibles.

Como en el caso de la estreptomina, en donde se ha demostrado que estos antibióticos se unen a la subunidad 30S del ribosoma interfiriendo con la función en el sitio A del ribosoma. Existe cierta analogía en el modo de acción que tienen otros aminoglucósidos como kanamicina, neomicina, nebramicina y otros.

c) Presencia de factores de resistencia (R).

Se considera que la resistencia que presentan las bacterias a ciertos antibióticos se debe a la presencia de los factores de resistencia (R). (8,13,19, 22,23,42)

El factor R es considerado genéticamente como un ejemplo de los llamados plásmidos, elementos cromosómicos bacterianos del citoplasma que presentan duplicación autónoma. La característica más importante de los llamados factores de resistencia (R), es el que imparten dicha característica a ciertos microorganismos frente a los antibióticos, los cuales causan trastornos en el

mecanismo genético de aquéllos, similares a los que se producen por mutación. (8,42)

d) Alteración de la permeabilidad de la membrana.

Una propiedad común de todos los aminoglucósidos es que poseen una carga positiva neta a pH fisiológico, debido a los múltiples grupos amino con un elevado pK. Cualquier molécula con carga positiva es transportada de inmediato hacia el interior de la bacteria a través de su membrana, la que mantiene su potencial eléctrico negativo. Una reducción en el potencial eléctrico disminuye la velocidad de penetración del antibiótico y genera resistencia de la célula. (19)

Gentamicina

La gentamicina, se aisló por primera vez en 1961, de diferentes especies de Micromonospora, por separación cromatográfica de partición, junto con numerosos componentes adicionales en los laboratorios de investigación de Shering Corporation (EUA).

Furlerton en 1905 y Orskov en 1923, realizaron observaciones que llevaron a clasificar taxonómicamente las especies del género Micromonospora. Entre las especies de microorganismos productores de gentamicina del género Micromonospora se encuentran; Micromonospora purpurea, Micromonospora echinospora, Micromonospora chalsea, Micromonospora fusca y Micromonospora sp. (36,49), cuyas características son las siguientes;

No forman micelio aéreo verdadero. Tienen conidios producidos aisladamente en los extremos de conidiosporas especiales. Conidiosporas cortas, usualmente saprófitos que se encuentran en el suelo, en tierras abonadas calientes, en el fondo de los lagos y en el polvo. No crecen en medios líquidos.

Como ya se mencionó anteriormente la gentamicina pertenece a la familia de aminoglucósidos y es una mezcla de C_1 , C_{1a} , C_2 , gentamicinas igualmente antimicrobianas, son compuestos polibásicos de estructura semejante a las kanamicinas y constituidas por 2-deoxiestrepta-

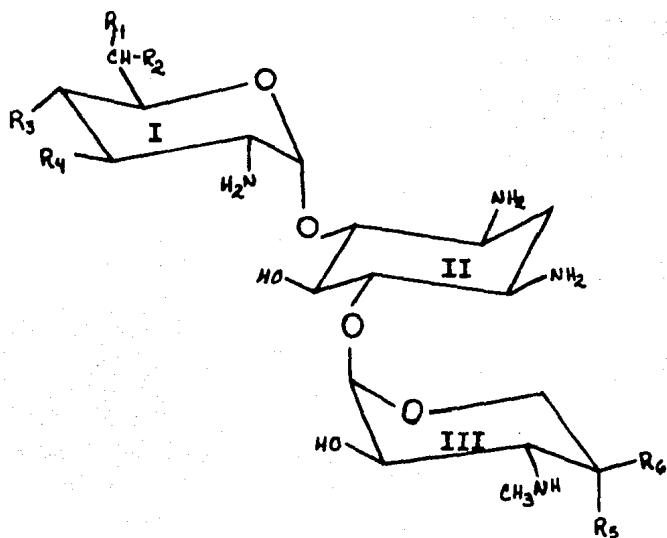
mina, común a todo este grupo de aminoglucósidos, se encuentra unida a dos aminoazúcares, la purpurosamina y la garosamina o gentosamina. (24,35,49)

El complejo de sustancias activas, introducido en la clínica, contiene esencialmente las fracciones de gentamicina C_1 , en un 29.5% (25-35%), C_{1a} 27.8% (20-31%) y C_2 42.7% (40-45%). (tabla 2)

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas

Antibiótico	Peso molecular	Fórmula
Gentamicina C_1	477.60	$C_{21}H_{43}N_5O_7$
Gentamicina C_{1a}	449.55	$C_{19}H_{39}N_5O_7$
Gentamicina C_2	463.58	$C_{20}H_{41}N_5O_7$

También puede contener vestigios de otros componentes de gentamicina. Las distintas composiciones no producen modificaciones esenciales, las diversas moléculas surten los mismos efectos ampliamente, de modo que se menciona el complejo gentamicina genéricamente como gentamicina, cuya fórmula se presenta en la figura 1. (35,49)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Gentamicinas A	H	OH	OH	OH	H	OH
C _{1a}	H	NH ₂	H	H	OH	CH ₃
C ₂	CH ₃	NH ₂	H	H	OH	CH ₃
C ₁	CH ₃	NHCH ₃	H	H	OH	CH ₃

Fig. 1: La estructura de las gentamicinas: Anillo I es purpurosamina, II es 2-deoxitreptamina y III es gentosamina (gentamicina A) o garosamina (gentamicina C's).

La gentamicina es un compuesto básico, estable, muy soluble en agua (más de 20 mg/ml), etilenglicol, formamida, NaOH (0.1N) y HCl (0.1N). Es insoluble o poco soluble en solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, benzol y carbohidratos halogenados.

La gentamicina que se encuentra en el mercado, es estable en solución y su actividad no decrece a temperatura de congelador, refrigerador, ambiental o de incubadora. Resiste temperaturas de más de 100°C y admite una breve esterilización en autoclave. La estabilidad se mantiene entre un pH amplio con intervalo de 2.2 a 10.

Como antibiótico de amplio espectro, la gentamicina es de especial importancia clínica (ya que es efectivo contra Staphylococcus aureus penicilinas positivo) mostrando también su efecto antibacteriano contra microorganismos Gram negativos, incluyendo Pseudomonas, Serratia y coliformes resistentes a la kanamicina.

El uso masivo de gentamicina ha alterado el espectro de sensibilidad de las poblaciones bacterianas. Por eso, el empleo de este preparado, tan importante para el tratamiento de casos clínicos, debería efectuarse solo con especial consideración del antibiograma.

El aumento del contenido de distintas sales de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} (carbonato, sulfato, cloruro, fosfato, nitrato) en el medio de cultivo, reduce hasta en más

de 30 veces la actividad de la gentamicina. (18,24,25, 26,27,28,33,49)

Mecanismo de acción

En forma similar a la estreptomina, la gentamicina altera la síntesis proteica de microorganismos en proliferación logarítmica, produciendo un mayor efecto de falsa lectura en el ácido ribonucléico mensajero. De acuerdo con ensayos in vitro, al cabo de pocos minutos de agregar la gentamicina, se altera la síntesis de proteínas en las poblaciones sensibles, resultando un efecto bactericida. (29,39,46,52)

La cinética del efecto antibacteriano depende de la concentración, por lo cual la terapéutica con concentraciones variables, produce diferentes intensidades de acción bactericida de la gentamicina, que logra actuar contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos con concentraciones de 1-2 (0-5.5) mcg/ml, estas concentraciones se lograron con la dosificación habitual en el suero y otros líquidos orgánicos. La concentración bacteriostática es aproximadamente dos o tres veces mayor que la concentración bactericida, el efecto óptimo se obtiene con un pH de 7.8, con pH de 6.6 las concentraciones deben ser hasta 8 veces mayores y con un pH de 5.5 hasta más de 30 veces.

La formación de resistencia in vitro se alcanza con diferentes especies de microorganismos, que adquieren valores de resistencia de 40, o más de 80 veces el valor inicial. El cultivo de microorganismos resistentes a la gentamicina aparece pleomórfico, las bacterias muestran un comportamiento variable en la coloración de Gram. Al aumentar el empleo de la gentamicina, la resistencia aumenta hasta un 30% y más de las enterobacterias aisladas, en los servicios de terapia intensiva.

Con la administración oral se absorben tan solo pequeñas porciones de gentamicina, ya que de una dosis de 1.2 g se encontrará un 0.2% en la orina de 24 horas. Por ello, la gentamicina puede administrarse sólo por vía intramuscular, intravenosa, intraventricular y menos frecuente por aplicación tópica. Se elimina principalmente por vía renal (filtración glomerular) y como no hay manejo metabólico por parte del organismo, se encuentra en la orina en forma antimicrobiana activa. (33,49, 51)

Toxicidad

Con la gentamicina, se presentan en primer término los efectos colaterales típicos de los antibióticos aminoglucósidos o sea la afección del nervio auditivo y de la función renal. La frecuencia de los efectos tóxicos depende de la dosis y la concentración, pero sin que

exista ninguna correlación absoluta entre la cantidad total de gentamicina aplicada.

Las afecciones ototóxicas se conocen primordialmente por disfunción vestibular, suelen aparecer en la segunda semana de tratamiento, pero pueden aparecer aún algunos días o semanas después de terminada la medicación; mareos, zumbidos, síndrome de Menière, dolores de cabeza, vómitos y ataxia. Cuando aparecen los primeros signos de reacciones tóxicas, a menudo son síntomas precoces y justifican la suspensión del tratamiento.

En el 1 al 3% de los casos tratados se observan reacciones nefrotóxicas, sobre todo con aumento de los valores de nitrógeno en la sangre, más raras son la proteinuria y el sedimento urinario patológico.

Se ha observado que en experimentos hechos con animales, la gentamicina provoca, después de la neomicina, una alta incidencia de bloqueo neuromuscular que puede contrarrestarse mediante la administración de calcio y aumentarse con la aplicación de curare. (35,49,53,54)

Usos

La gentamicina es un antibiótico importante para el tratamiento de diversas infecciones, siendo de amplio espectro, desempeña el papel principal entre los antibióticos aminoglucósidos para el tratamiento sobre

todo de enfermedades causadas por microorganismos Gram negativos. En primer lugar se aplica en caso de enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella sp Escherichia coli y Proteus sp. En caso de enfermedades crónicas del tracto urogenital sin formación de cálculos, el tratamiento con gentamicina ofrece de un 70 a 80% de curación, mientras que, en caso de nefrolitiasis, las probabilidades de éxito disminuyen hasta por debajo del 40%. En caso de pielonefritis infantil, el efecto terapéutico se ve reducido a menudo por infecciones producidas por Candida sp.

Las enfermedades pulmonares y subagudas por bacterias Gram negativas Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Escherichia coli, suelen reaccionar favorablemente a un tratamiento parenteral o inhalatorio con gentamicina. Así también en otros padecimientos como septicemias, infecciones cutáneas, osteomielitis, infecciones articulares contra infecciones por gonococos y gastroenteritis. (38,49)

Antibióticos inhibidores del ribosoma bacteriano

Muchos antibióticos (55) se han identificado como inhibidores de la síntesis proteica, así también se ha reportado que su principal sitio de acción es el ribosoma, encontrando una serie de efectos de inhibición muy complejos a nivel funcional. Igualmente se ha estudiado el papel que desempeñan los aminoglucósidos como inhibidores de la función ribosomal, provocando informaciones falsas en la subunidad 30S.

Existen dos funciones asociadas a la subunidad 30S en la síntesis proteica:

- 1) Proveer un sitio de unión para el ARN_m que es desplazado durante la transposición, etapa que se lleva a cabo durante el proceso de traducción en la síntesis.

- 2) Permitir la unión de la N-formil-metionil-ARN_t y otros tipos de aminoacil-ARN_t, antes de formar un nuevo enlace peptídico, esto se ha denominado como aceptor o sitio del aminoacil.

Se han sugerido 3 mecanismos para inhibir la síntesis proteica mediante la subunidad 30S:

- 1) Prevenir la acción del ARN_m.
- 2) Interferir el camino del ARN_m en la subunidad 30S durante la transposición.
- 3) Bloquear el aminoacil aceptor.

Efectos bioquímicos y mecanismos de acción

Tomando en cuenta los datos a nivel de acción genética y bioquímica de los aminoglucósidos y particularmente de la estreptomycin, se hace evidente que el ribosoma es el sitio de acción de éstos y los resultados se interpretan en base a los efectos que provocan en la síntesis de proteínas. (55)

Sensibilidad

No se ha encontrado el mecanismo exacto de acción que tienen los aminoglucósidos, ya que la forma de lesión no se ha interpretado claramente. Cuando se han expuesto cepas sensibles a concentraciones bajas de aminoglucósidos, se han observado efectos como:

- 1) Suspensión de la respiración.
- 2) Eliminación de nucleótidos, aminoácidos y de potasio.
- 3) Inhibición de síntesis proteica.
- 4) Estimulación para la síntesis de ARN. (55)

Resistencia

Existen cepas mutantes que resisten concentraciones hasta de 1 mg/ml de algunos aminoglucósidos, la mutación existe por haber un sitio de acción específico. Se detecta la mutación en las células que presentan resistencia a los aminoglucósidos, porque se observa la eliminación del sitio activo.

Dependencia

Algunas bacterias mutantes son resistentes y su sensibilidad se detecta haciendo uso de medios de cultivo que contienen concentraciones de antibióticos. Cuando en el medio no hay crecimiento se puede decir que ya no existe síntesis de macromoléculas y se caracteriza por una disminución de actividad de la síntesis de proteínas.

El fenómeno de dependencia puede explicarse mediante el uso de antibióticos aminoglucósidos catiónicos que son capaces de ensamblar con el ribosoma. (55)

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La quimioterapia basada en el diagnóstico clínico y el examen bacteriológico determina la elección y dosificación de los compuestos quimioterapéuticos que han de utilizarse en un proceso infeccioso. (3)

Además, las pruebas de susceptibilidad se realizan durante la terapia para observar las posibles variantes de resistencia del microorganismo frente al medicamento. (3)

La susceptibilidad de un microorganismo a un antibiótico y a otros agentes quimioterapéuticos, se determina por la prueba del disco (1,3,15,44) y la prueba de dilución. (2,5,6,11,17,45)

La prueba de susceptibilidad cuantitativa se puede realizar por la dilución del antimicrobiano en medio líquido. Esta es la que se utiliza en nuestro estudio. (4,12,17,50,56)

Se adicionan a un cultivo de bacterias en estudio, cantidades específicas del antibiótico, preparado en concentraciones decrecientes por la técnica de dilución seriada. Después de un período de incubación adecuado, se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). (1,3,4,17,26,63)

Estas concentraciones generalmente se reportan como:

microgramos por mililitro $\mu\text{g/ml}$

Unidades internacionales por mililitro UI/ml y

micromoles por mililitro $\mu\text{moles/ml}$

Para establecer el procedimiento y para evaluar los resultados, hay que considerar varios factores:

- a) Selección del medio de cultivo.
- b) Procedimiento para preparar diluciones seriadas.
- c) Preparación del inóculo.
- d) Inoculación e incubación.
- e) Lectura de los resultados.

Selección del método apropiado

Para determinar cuál es la técnica más apropiada para una situación dada, hay que considerar el equipo disponible, el número y tipo de microorganismos, antimicrobianos y la intención para la cual se efectúan las pruebas. (3)

Pueden ser utilizadas cualquiera de las técnicas, de difusión en agar o de dilución seriada, ofreciendo las siguientes ventajas:

1) La prueba para cada microorganismo proporciona una guía para la selección de la terapia.

2) El estudio relacionado con la actividad y el espectro antimicrobiano de nuevos agentes antimicrobianos.

3) El estudio de las poblaciones microbianas para documentarse del cambio en los patrones de resistencia bajo efectos selectivos del uso de antimicrobianos.

4) Determinación de antibiogramas, señal epidemiológica o por la identificación presuntiva de un microorganismo.

En el laboratorio clínico, se realizan muchos estudios por las razones 1 y 4. Generalmente, la prueba de difusión en agar (disco) es adecuada, pero la técnica de dilución seriada se emplea en el laboratorio clínico por su mayor exactitud.

La prueba de difusión en agar es la más conveniente, su uso día a día, es generalmente satisfactorio. La técnica de dilución seriada tiene la ventaja sobre el método de difusión en agar, que se puede determinar la concentración bactericida mínima (CRM) y se pueden combinar los antimicrobianos para su estudio.

Principales características de los microorganismos
utilizados en este estudio

Staphylococcus aureus

Familia I Micrococcaceae.

Género II Staphylococcus.

especie aureus.

Mide aproximadamente 1 micra de diámetro, su agrupación es característica en racimos de uvas aunque puede encontrarse en cadenas cortas o en pares. Se tiñe con colorantes simples. Es una bacteria Gram positiva, no forma esporas, no tiene cápsula, es una bacteria inmóvil, crece abundantemente en medios sólidos, las colonias son redondas, lisas, elevadas y de aspecto brillante. Forman pigmentos que dan a las colonias color amarillo oro, son hemolíticas. (10,32)

Medios selectivos: La mayor parte de Staphylococcus patógenos coagulasa positivos, son capaces de crecer en presencia de telurito reduciéndolo para dar colonias de color gris-negro. Los medios de telurito tienden a ser selectivos y han sido útiles para aislar estafilococos de material muy contaminado, como muestras fecales. Con propósitos diferenciales, aunque no selectivos, puede incorporarse manitol y un indicador ácido-bá-

sico como rojo de fenol. Los medios de aislamiento pueden hacerse selectivos agregando NaCl al 10%.

Necesidades nutritivas: Los estafilococos crecen fácilmente en los medios usuales de extractos de carne y peptona, pero lo hacen más profusamente en agar sangre. En medios semisintéticos que contienen hidrolizado de caseína, se necesita por lo general ácido nicotínico y tiamina y el crecimiento puede aumentar incluyendo vitaminas como biotina.

En medios químicamente definidos, las cepas recién aisladas necesitan un número considerable de aminoácidos, generalmente cistina, leucina, prolina, valina, glicina, pero las necesidades pueden variar según la cepa utilizada.

Toxinas: Los estafilococos pueden producir enfermedad tanto por su capacidad de multiplicación y diseminación en los tejidos, como por la producción de diversas sustancias extracelulares como son:

a) **Exotoxina:** es una sustancia filtrable termolábil, letal para animales por inoculación parenteral, que provoca necrosis de la piel.

b) **Hemolisinas:**

Alfa; actúa sobre eritrocitos de conejo, lesiona las plaquetas, también tiene acción sobre el músculo liso de los vasos.

Beta: es una esfingomielinasa que provoca la reacción frío-calor, consistente en que los hematíes humanos y de carnero contenidos en caldo de cultivo o en agar-sangre se lisan después de ser incubados a 37°C, siempre y cuando hayan sido mantenidos durante la noche a temperaturas frías.

Delta: es una fosfolipasa, tóxica para los leucocitos y eritrocitos humanos y de conejo.

Gamma: posee menor potencia que las demás y no ha sido aún bien caracterizada.

c) Leucocidina: es una sustancia soluble que destruye a los leucocitos de diversas especies de animales; es antigénica y más termolábil que la exotoxina, siendo incierto su papel en la patogenia.

d) Enterotoxina: es un material soluble producido por algunas cepas de estafilococos. Es una proteína termoestable de peso molecular 3.5×10^4 que resiste la ebullición durante 30 minutos y la acción de las enzimas intestinales. La ingestión produce vómitos y diarrea solamente en el hombre y en los monos.

e) Coagulasa: la mayoría de los estafilococos patógenos para el hombre producen esta sustancia proteica que se comporta como enzima y que coagula el plasma oxalatado o citratado.

Otras toxinas son, por ejemplo: hialuronidasa y estafilocinasa.

El prototipo de lesión estafilocócica es el fu rúnculo u otro absceso localizado. Cuando los estafilococos se establecen en un folículo piloso dan lugar a necrosis del tejido, se produce coagulasa que deposita la fibrina alrededor de la lesión y en el interior de los vasos linfáticos, dando lugar a la formación de una pared que limita el proceso inflamatorio y, posteriormente, de tejido fibroso. Esta pared también interfiere con el libre acceso de agentes antimicrobianos.

En el centro de la lesión el tejido necrótico se licúa y el absceso se rompe en la dirección de menor resistencia. A esto sigue el llenado lento de la cavidad con tejido de granulación y la curación eventual. A partir de cualquier foco, los microorganismos pueden propagarse por los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo a otras partes del cuerpo lo cual da origen a la presencia de trombos sépticos en el interior de las venas. (32)

Escherichia coli

Familia I Enterobacteriaceae.

Género I Escherichia.

especie coli.

Son bacilos cortos Gram negativos que miden aproximadamente de 2 a 4 micras de longitud, por 0.4 a 0.7 micras de ancho, pueden formar cadenas. En condiciones desfavorables, presentan formas alargadas filamentosas, rara vez presentan cápsula. Es un microorganismo móvil. Las colonias son redondas, convexas, lisas con bordes definidos, algunas cepas son hemolíticas en agar san gre. En los medios EMB y ENDO, las colonias presentan un brillo metálico característico. (10,32)

Características de crecimiento: Fermentan a mu chos carbohidratos con producción de ácido y gas.

Para la identificación de cepas de Escherichia coli se emplean las siguientes pruebas bioquímicas llamadas "INViC":

1) Reacción del Indol: por la capacidad de producir indol en caldo con triptofano.

2) Rojo de metilo: se observa por el pH final del medio de cultivo en caldo con 0.5% de glucosa después de 4 días de incubación a 37°C. Escherichia coli da

la reacción positiva, obteniéndose un pH inferior a 4.5.

3) Reacción de Voges-Proskauer; producción de acetilmetilcarbinol a partir de la dextrosa. En presencia de un álcali, este compuesto es oxidado a diacético y da una coloración rosa. La reacción es negativa para Escherichia coli.

4) Prueba del citrato; utilización del citrato como única fuente de carbono característica de microorganismos de vida libre. Esta prueba es negativa para Escherichia coli.

Todos los cultivos contienen variantes y mutantes estables con respecto a morfología colonial (rugosa o lisa), características antigénicas, comportamiento bioquímico y resistencia a los virus.

La cepa K-12 de Escherichia coli se ha estudiado extensamente desde el punto de vista genético y se ha demostrado en ella recombinación sexual de características hereditarias.

Posee una estructura antigénica muy compleja y las cepas son heterogénicas en su comportamiento serológico. La clasificación está determinada por sus antígenos "O" somáticos termoestables (más de 120 diferentes) por sus antígenos capsulares "K" termolábiles y por sus antígenos flagelares "H".

Escherichia coli constituye parte de la flora normal del intestino, sólo se transforma en patógena cuando alcanza tejidos fuera del tracto intestinal, particularmente el tracto urinario, las vías biliares, el peritoneo o las meninges, provocando inflamaciones en estos sitios. Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas pueden alcanzar el torrente circulatorio y provocar septicemias. (32)

Las infecciones intestinales producidas por Escherichia coli se deben a ciertos tipos de cepas:

Enteropatógenas: están asociadas con diarreas infantiles.

Enteroinvasivas: aquéllas capaces de invadir las células epiteliales del intestino, y dar lugar a un síndrome parecido al de la disentería bacilar (colitis), similar al que producen ciertas cepas virulentas de Shigella.

Enterotoxigénicas: algunas cepas de Escherichia coli producen una exotoxina termolábil que está bajo control genético de un plásmido transmisible. Actúa a nivel de la porción superior del intestino delgado pero no en el intestino grueso. Es posible que estos microorganismos tengan un papel importantísimo en los procesos diarreicos agudos de los niños de corta edad, en la diarrea del turista y en los episodios de intoxicación alimentaria. (10)

PARTE EXPERIMENTAL

M A T E R I A L

Cajas de Petri de 150 X 50 mm, tubos de ensaye de 16 X 150 mm, tubos de ensaye de 13 X 100 mm, tubos de ensaye de 12 X 75 mm, matraces erlenmeyer de 250 ml, vaso de precipitado de 1000 ml, pipetas graduadas de 1 ml, pipetas graduadas de 5 ml, pipetas graduadas de 10 ml, portaobjetos, cubreobjetos, agitador de vidrio, embudo, frascos para colorantes y reactivos, frascos limpios y estériles, asa microbiológica, tela de alambre, mechero, tripié, gradillas, abatelenguas, espejo vaginal, gasa, algodón, palillos de madera, hisopos estériles, papel manila, papel pH, microscopio, autoclave, horno, incubadora, potenciómetro.

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo cerebro-corazón.

Caldo manitol rojo de fenol.

Agar con eosina y azul de metileno.

Agar gelosa-sangre.

Agar con sal y manitol.

Medio de Kligler.

Medio de SIM.

Caldo de urea.

Caldo Mueller-Hinton.

REACTIVOS

Colorantes de Gram.

Reactivo de Ehrlich.

Plasma humano citratado o de conejo.

Solución de NaOH al 0.1N.

Cloruro de sodio.

Ampolletas de Garamicina (equivalente a sulfato de gentamicina) de 80 mcg/2 ml.

MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de:

Exudados faríngeos.

Exudado nasal.

Secreciones vaginales.

Secresión de lesión cutánea.

Esperma.

Espuito.

Heces.

Orina.

TOMA DE MUESTRA DE LOS PRODUCTOS ESTUDIADOS

a) La muestra de garganta se recolecta con un hisopo estéril, se humedece con caldo cerebro-corazón y, mientras se mantiene baja la lengua del paciente con la ayuda de un abatelenguas, la garganta bien expuesta e iluminada, se frota enérgicamente la parte posterior de la misma con el hisopo, ambas amígdalas y la fosa tonsilar, y las partes donde haya inflamación, exudado o ulceraciones. Deberá tenerse cuidado para evitar tocar con la torunda, los labios o la lengua.

b) La recolección de esputo se realiza de diferentes maneras:

- i) Succión nasotraqueal o faringotraqueal.
- ii) Aspiración transtraqueal.
- iii) Esputo expectorado:

- 1) Se prefirieron muestras de esputo expectorado por la mañana. 2) lavado de la boca con agua para evitar la contaminación con los residuos de alimentos
- 3) se dan instrucciones a los individuos de que refunan el esputo producido por la tos expulsiva profunda o intensa (esputo traqueobronquial), con el mínimo de contaminación por la saliva y sustancias o productos que pueden proceder de la nariz y de la nasofaringe; 4) el esputo tiene que ser depositado en frascos de boca ancha muy limpios, y que tengan tapones que se ajusten exacta

mente, teniendo precauciones necesarias para que no se contamine el exterior del recipiente y no se produzcan aerosoles. En los infantes y los niños de corta edad, la tos puede ser provocada tocando las fauces para la obtención del esputo.

c) El material uterino o vaginal puede ser obtenido después de 24 horas de que la paciente realizó el último lavado vaginal o la ducha vaginal. Mediante el uso de hisopos estériles y de espejos vaginales, se hizo la toma de muestras de acuerdo con el caso.

d) Con respecto a la recolección del esperma, se hizo lavando el glande y la fosa navicular con agua y jabón neutro. Fué recolectado 96 horas después de la última emisión seminal, por eyaculación provocada o coitus interruptus. Para esta muestra no deben usarse condones, por los posibles resultados dudosos en lo que se refiere al efecto espermatocida de los polvos en que se enrolla el látex con que se fabrican los condones.

e) La toma de orina se realiza generalmente mediante micción media, siempre y cuando se tenga la cooperación del paciente. En el caso de las mujeres limpiar perfectamente bien la vulva con agua y jabón neutro; en los hombres lavar el glande y las partes vecinas con agua y jabón. Hay otros métodos para la toma de orina y que no fueron realizados, como; cateterización, punción suprapúbica y bolsas estériles.

f) Para la realización de los coprocultivos se requiere de materia fecal, recogida en frascos que no necesariamente deben estar esterilizados. En caso de diarreas, se llevó a cabo una toma rectal introduciendo un hisopo estéril o cucharilla de vidrio a través del ano frotando sobre las paredes del recto para recoger la mucosa rectal.

g) En el caso de lesiones en la piel, se hizo la asepsia previa con agua o solución salina estériles. Por medio de un hisopo estéril se toma la muestra y si se requiere se hace presión hasta la obtención de secreción purulenta.

h) La toma de la muestra nasal, se efectuó con un hisopo estéril que se introdujo en las fosas nasales frotándolo por las paredes.

2) A las muestras recolectadas, se les efectúa un frote y la tinción de Gram, al observarlas al microscopio se determina la morfología y afinidad tintorial de los microorganismos que supuestamente ocasionan la infección. Las muestras obtenidas se inocularon y estriaron directamente en cajas Petri con medios de cultivo: agar gelosa-sangre, agar con sal y manitol y agar con eosina y azul de metileno

En el caso de la orina se efectúan técnicas cuantitativas que son de mayor significado para el diagnóstico de las enfermedades de las vías urinarias, llevándose a ca-

bo la técnica de estriación directa con asa calibrada; la que se realiza empleando una asa de platino de 4 mm, con la que se puede recoger 0.01 ml de muestra, se inoculan las cajas de agar sangre y agar eosina y azul de metileno, estriando toda la superficie de ambas cajas, se incuban durante toda la noche a 37°C y efectúa su lectura a la mañana siguiente. Se examinan y cuentan las colonias de las cajas, se multiplica el recuento de colonias de las cajas, se multiplica el recuento de colonias por 100 (se usó 0.01 ml) para estimar el número por mililitro de orina. Cuando el número de colonias es menos de 10⁴ bacterias por mililitro de orina se considera como contaminación, y más de 10⁵ indican una infección del aparato urinario.

Se incuban las cajas a 37°C durante 24 horas.

3) Se lleva a cabo la selección de microorganismos supuestamente patógenos, que se confirma con las pruebas bioquímicas que éstos realizan en los diferentes medios de cultivo.

Staphylococcus aureus produce un halo de hemólisis acentuada en agar gelosa-sangre cuando la cepa es productora de la enzima hemolítica denominada hemolisina o estafilolisina.

El medio de agar con sal y manitol e indicador, es selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos

nes, ya que casi todas las demás bacterias son inhibidas por la elevada concentración de sal. Las colonias de estafilococos patógenos se verán rodeadas de un halo de color amarillo, que indica la fermentación del manitol.

Escherichia coli en el medio de agar con eosina y azul de metileno (EMB), desarrolla colonias redondas, convexas, de color oscuro, hay un vire de coloración en el medio y además con reflejo metálico característico.

4) Se realizan pruebas confirmativas para verificar la identificación de los microorganismos patógenos:

Para determinar la patogenicidad de Staphylococcus aureus se practican las siguientes pruebas:

Para identificar la enzima manitolasa que se considera factor de patogenicidad de Staphylococcus aureus, se efectúa la prueba del manitol que consiste en inocular una colonia previamente identificada por tinción de Gram, en un caldo manitol rojo de fenol e incubar a 37°C por 24 horas. Pasado este período de incubación se observa un vire en la coloración del medio de rojo a amarillo.

Se emplea también la prueba de la coagulasa que es 100% confirmativa para saber si el microorganismo es patógeno. El fundamento de esta prueba es como sigue: La coagulasa libre es una sustancia semejante a la trom-

bina que se haya presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con una poca cantidad de plasma en un tubo de ensaye, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

Para llevarla a cabo se inoculan 0.5 ml de una dilución 1:4 de plasma de conejo con una asa que contenga abundante material de la colonia sospechosa. Las cepas coagulasa positivas producen usualmente un coágulo visible en 1 a 4 horas. Las pruebas que aparecen negativas en 4 a 6 horas, deben continuar incubándose y ser leídas otra vez luego de 16 a 18 horas, ya que algunas cepas de Staphylococcus aureus producen coagulasa muy lentamente.

Las pruebas bioquímicas que se realizan para la identificación de Escherichia coli y otras enterobacterias son en los siguientes medios:

a) Medio de Kligler.

El medio de Kligler contiene dos hidratos de carbono: lactosa, con concentración del 1%, y glucosa en concentraciones del 0.1%. La fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de flauta) y anaeróbicamente (en la capa inferior). El tubo se siembra en estria y piquete, cuyo desarrollo se interpreta por el vire del indicador que cambia de rojo a amarillo.

- b) Medio semisólido SIM (sulfuro-indol-motilidad).

Se siembra por piquete, algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen produciendo el ácido sulfhídrico (SH_2). El gas incoloro SH_2 reacciona con una sal pesada, citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro insoluble, sulfato ferroso. La capacidad del microorganismo de desdoblar el indol de la molécula de triptófano, se detecta cuando al agregar reactivo de Ehrlich se forma un anillo rosa en la zona de contacto al momento o después de algunos minutos, se da como positiva, si no hay ninguna coloración la prueba es negativa. Se determina la motilidad al observar la diseminación del microorganismo en el piquete.

- c) Caldo manitol rojo de fenol.

Las bacterias patógenas fermentan el D-manitol. Cuando la reacción es positiva, hay un vire de coloración del rojo al amarillo

- d) Caldo de urea.

En este medio se efectúa la hidrólisis de la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la ureasa. Cuando el microorganismo es ureasa positivo se observa el cambio de coloración de rojo ($\text{pH} = 6.8$) a rojo cereza ($\text{pH} = 8.1$ o más alcalinidad).

La susceptibilidad a los antibióticos por la técnica de dilución seriada se realiza de la manera siguiente:

1) En 10 tubos de 13 X 100 mm limpios, esterilizados y marcados del 1 al 10, se colocan con una pipeta 0.5 ml del caldo de dilución (caldo Mueller-Hinton) en los tubos marcados del 2 al 10. Repetir la operación el mismo número de series de tubos como de muestras que se tengan a prueba. El tubo marcado con el 1 se tiene como control positivo.

2) Para la preparación del antibiótico se utiliza una ampolleta de Garamicina (nombre comercial) conteniendo sulfato de gentamicina (equivalente a gentamicina base), cuya concentración es de 80 mg/2ml, lote: ME83 AMKZ 29, Laboratorio Scheramex. Se utiliza como diluyente caldo Mueller-Hinton.

Cálculos: 80 mg/2 ml	80,000 mcg/2ml
0.5 ml	20,000 mcg/0.5 ml
0.5:20	1,000 mcg/1 ml
1.0 ml	1,000 mcg/1 ml
1:5	200 mcg/1 ml
0.5 ml	100 mcg/0.5 ml

3) El inóculo se prepara, tomando de 2 a 3 colonias en 6 ml de caldo Mueller-Hinton, que se lleva a incubar a 37°C durante toda la noche. Se prepara una di-

lución de 1:1,000 en caldo. Después de efectuar la dilución, se toma una muestra depositándola en una celda fotométrica para medir el % de transmitancia a 475 nm (filtro azul), debiendo dar como resultado 98% y tomando este valor como referencia para que las demás muestras se estandaricen. Se tiene así una concentración aproximada de 10^5 a 10^6 microorganismos por mililitro.

4) Agregar a la serie de tubos que se han marcado del 1 al 10, 0.5 ml del inóculo. El volumen final de cada tubo es ahora de 1 ml, y la concentración del antibiótico va de 100 mcg/ml a 0.39 mcg/ml, en orden decreciente por diluciones al doble. (tabla I)

5) Incubar las series de tubos a 37°C durante 12 a 18 horas. El último tubo, donde hay menor concentración del antibiótico de la serie y que no presente crecimiento, se toma como índice de concentración bacteriostática.

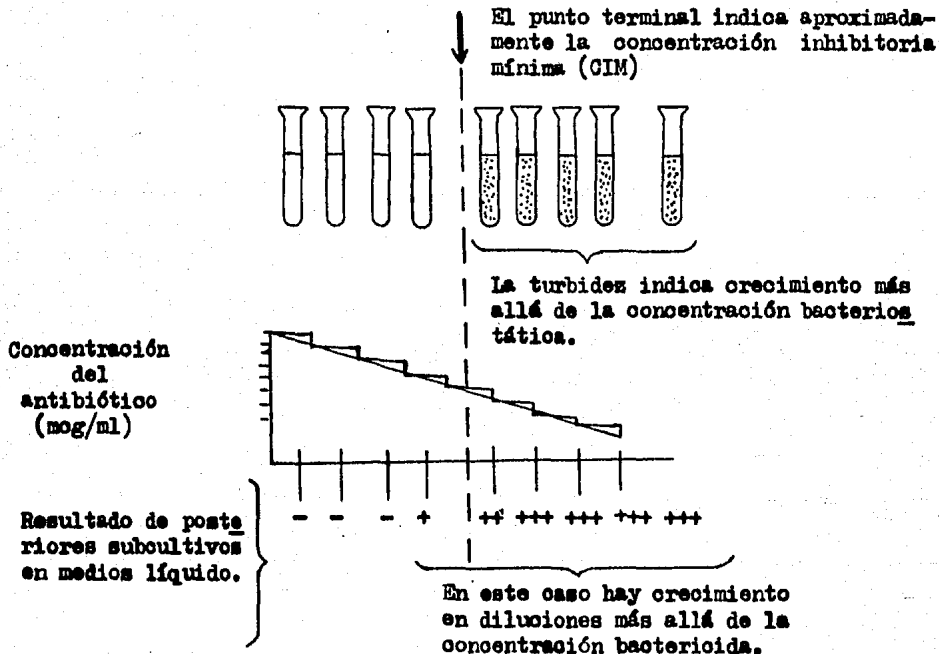
6) Para determinar la concentración bactericida, se lleva a cabo la resiembra de los tubos que presenten inhibición, a tubos con 0.5 ml de caldo Mueller-Hinton. El resultado se obtiene después de incubar a 37°C durante 12 a 18 horas. (tabla II)

Tabla I: Dilución seriada de antibióticos
(preparación de los tubos)

Tubo	Diluyente (medio) agregado (ml)	Antibiótico agregado	Cultivo diluido agregado (ml)	Concentración de antibiótico final (mcg/ml)
1	-	0.5 ml	0.5	100
2	0.5	0.5 ml	0.5	50
3	0.5	0.5 del tubo 2	0.5	25
4	0.5	0.5 del tubo 3	0.5	12.5
5	0.5	0.5 del tubo 4	0.5	6.25
6	0.5	0.5 del tubo 5	0.5	3.125
7	0.5	0.5 del tubo 6	0.5	1.56
8	0.5	0.5 del tubo 7	0.5	0.78
9	0.5	0.5 del tubo 8*	0.5	0.39
10	0.5	nada	0.5	cero

* Eliminar 0.5 ml del tubo 9.

Tabla II: Esquema de la determinación de los niveles bacteriostático y bactericida de un antibiótico para un microorganismo determinado.



RESULTADOS

Se estudiaron 58 cepas de Staphylococcus aureus frente a concentraciones decrecientes de gentamicina y se agruparon de acuerdo al origen de la muestra:

En la tabla III se enlistan las concentraciones bactericidas y en la tabla IV las concentraciones bacteriostáticas. En la tabla V se hace la comparación entre la concentración bactericida y bacteriostática, el número de cepas y el porcentaje acumulativo.

Observando que la concentración bactericida oscila entre 0.78 y 100 mcg/ml y la concentración bacteriostática entre 0.39 y 100 mcg/ml.

En las 50 cepas de Escherichia coli estudiadas, los resultados se clasificaron de la siguiente manera:

En la tabla VI se dan las concentraciones bactericidas y en la tabla VII las concentraciones bacteriostáticas, que se enlistan de igual forma a las anteriores. En la tabla VIII se realiza la comparación entre la concentración bactericida y bacteriostática, dando el número de cepas y el porcentaje acumulativo. Se observa que la concentración bacteriostática oscila entre 1.56 y 100 mcg/ml y la concentración bactericida entre 6.25 y 100 mcg/ml.

Tabla III: Las concentraciones bactericidas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Staphylococcus aureus

Número de muestra	Origen de la muestra	100 mg/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CFEO
1	Exudado faringeo	B									
9	"	B									
20	"	B									
22	"	B									
19	"		B								
33	"		B								
41	"		B								
53	"		B								
8	"			B							
11	"			B							
15	"			B							
28	"			B							
34	"			B							
35	"			B							
42	"			B							
55	"			B							
2	"				B						
16	"				B						
23	"				B						
25	"				B						
31	"				B						
38	"				B						
40	"				B						
56	"				B						
58	"				B						
12	"					B					
36	"					B					
39	"					B					
57	"					B					
26	"							B			
49	"							B			
37	"							B			
50	"							B			
51	"							B			
13	Exudado vaginal	B							B		
21	"	B									
29	"	B									

B - bactericida.

CONTINUACION: Las concentraciones bactericidas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Staphylococcus aureus

Número de muestra	Origen de la muestra	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CERO
		mcg/ml									
30	Exudado vaginal	B									
44	"	B									
18	"		B								
48	"		B								
54	"			B							
27	Heces	B									
45	"	B									
46	"		B								
32	Orina			B							
52	Esperma		B								
10	"				B						
43	Exudado nasal		B								
3	Exudado faríngeo										Resistente
4	"										Resistente
5	"										Resistente
7	"										Resistente
17	Exudado vaginal										Resistente
6	Heces										Resistente
24	"										Resistente
14	Orina										Resistente
47	"										Resistente

B - bactericida.

Tabla IV: Las concentraciones bacteriostáticas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Staphylococcus aureus

Número de muestra	Origen de la muestra	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CERO
		mcg/ml									
1	Exudado faríngeo		b								
9	"		b								
22	"		b								
15	"										
20	"			b							
33	"			b							
41	"			b							
53	"			b							
11	"				b						
19	"				b						
34	"				b						
35	"				b						
55	"				b						
58	"				b						
8	"					b					
16	"					b					
23	"					b					
25	"					b					
28	"					b					
31	"					b					
38	"					b					
40	"					b					
42	"					b					
57	"					b					
2	"						b				
36	"						b				
12	"							b			
37	"							b			
39	"							b			
49	"							b			
50	"							b			
56	"							b			
26	"								b		
51	"								b		
13	Exudado vaginal		b								
29	"		b								

b - bacteriostático.

CONTINUACION: Las concentraciones bacteriostáticas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Staphylococcus aureus

Número de muestra	Origen de la muestra	100 mcg/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CERO
30	Exudado vaginal		b								
44	"		b								
48	"			b							
54	"			b							
18	"				b						
21	"									b	
45	Heces	b									
46	"		b								
27	"								b		
32	Orina			b							
52	Espërma		b								
10	"				b						
43	Nasal		b								
3	Exudado faríngeo		Resistente								
4	"		Resistente								
5	"		Resistente								
7	"		Resistente								
17	Exudado vaginal		Resistente								
6	Heces		Resistente								
24	"		Resistente								
14	Orina		Resistente								
47	"		Resistente								

b - bacteriostático.

Tabla V: Comparación entre la concentración bactericida y bacteriostática de gentamicina sobre Staphylococcus aureus.

99

Bacteriostático			Bactericida		
mcg/ml	No. de cepas	%	mcg/ml	No. de cepas	%
100.00	1	2	100.00	11	19
50.00	10	17	50.00	9	15
25.00	8	14	25.00	10	17
12.5	8	14	12.5	10	17
6.25	10	17	6.25	4	7
3.125	2	3	3.125	-	-
1.56	6	10	1.56	4	7
0.78	3	5	0.78	1	2
0.39	1	2	0.39	-	-
0.00	-	-	0.00	-	-
Resistente	9	16	Resistente	9	16
Total	58	100	Total	58	100

Tabla VI: Las concentraciones bactericidas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Escherichia coli

Número de muestra	Origen de la muestra	100 mg/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CERO
V	Exudado vaginal	B									
VI	"	B									
VII	"	B									
IX	"	B									
XI	"	B									
XII	"	B									
XV	"	B									
XVII	"	B									
XIX	"	B									
XX	"	B									
XXVIII	"	B									
XXXIX	"	B									
XL	"	B									
XLI	"	B									
XLV	"	B									
XLVIII	"	B									
XLIX	"	B									
XX	"		B								
XXI	"		B								
X	"			B							
XXXIII	"			B							
XXXIV	"				B						
II	Orina	B									
XIV	"	B									
XVIII	"	B									
XXV	"	B									
XXVIII	"	B									
XXXI	"	B									
XLII	"	B									
XLIV	"	B									
L	"		B								
XXII	"			B							
XXXVII	"				B						
XXIII	"					B					
IV	Exudado faringeo	B									
XIII	"	B									

B - bactericida.

CONTINUACION: Las concentraciones bactericidas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Escherichia coli

Número de muestra	Origen de la muestra	100 mg/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CERO
XXVI	Exudado faríngeo	B									
XXVII	"	B									
XXIX	"	B									
XLVI	"	B									
III	"		B								
XLVII	"				B						
XXXII	"					B					
XXXV	"					B					
XVI	Lesión	B									
XXXVI	Espuito	B									
VIII	Exudado vaginal	Resistente									
XLIII	"	Resistente									
I	Orina	Resistente									

B - bactericida.

Tabla VII: Las concentraciones bacteriostáticas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Escherichia coli

Número de muestra	Origen de la muestra	100 mg/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CEBRO
XXX	Erudado vaginal	b									
XLVIII	"	b									
V	"			b							
VI	"			b							
VII	"			b							
IX	"			b							
XI	"			b							
XV	"			b							
XIX	"			b							
XXXVIII	"			b							
XXXIX	"			b							
XL	"			b							
XLII	"			b							
XLV	"			b							
XLVI	"			b							
XLIX	"			b							
XII	"			b							
XVII	"			b							
XX	"			b							
XXI	"			b							
XXII	"			b							
XXXIII	"			b							
X	"				b						
XXXIV	"				b						
XLVIII	Orina	b									
II	"		b								
XIV	"		b								
XXIV	"		b								
XXXI	"		b								
XLIX	"		b								
XLVII	"			b							
XXII	"			b							
XXV	"			b							
XLII	"			b							
I	"				b						
XXXVII	"					b					
XLII	"						b				

b - bacteriostático.

CONTINUACION: Las concentraciones bacteriostáticas de gentamicina en forma decreciente que actúan sobre Escherichia coli

Número de muestra	Origen de la muestra	100 mcg/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	CERO
XXVI	Exudado faríngeo	b									
XXVII	"	b									
IV	"		b								
XXIX	"		b								
XLVI	"		b								
XIII	"			b							
III	"				b						
XLVII	"				b						
XXXII	"					b					
XXXV	"							b			
XVI	Lesión		b								
XXXVI	Esputo		b								
VIII	Exudado vaginal	Resistente									
XLVIII	"	Resistente									
I	Orina	Resistente									

b - bacteriostático.

Tabla VIII: Comparación entre la concentración bactericida y bacteriostática de gentamicina sobre Escherichia coli

Bacteriostático			Bactericida		
mcg/ml	No. de cepas	%	mcg/ml	No. de cepas	%
100.00	5	10	100.00	34	68
50.00	24	48	50.00	4	8
25.00	10	20	25.00	3	6
12.5	5	10	12.5	3	6
6.25	1	2	6.25	3	6
3.125	-	-	3.125	-	-
1.56	2	4	1.56	-	-
0.78	-	-	0.78	-	-
0.39	-	-	0.39	-	-
0.00	-	-	0.00	-	-
Resistente	3	6	Resistente	3	6
Total	50	100	Total	50	100

DISCUSION

El empleo exagerado de antibióticos ha determinado una variación en la susceptibilidad bacteriana y una disminución en el valor quimioterapéutico de un antibiótico por la resistencia que ofrecen los microorganismos.

Así queda determinado en el caso de gentamicina, considerada como un antibiótico de amplio espectro con acción sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas en dosis moderadas y que ahora requiere de dosis altas para llegar a actuar como bactericida.

Quizá para llegar a efectuar un estudio exacto sobre la dosis bacteriostática y bactericida de un antibiótico, haya que considerar una serie de factores que intervienen en la susceptibilidad de una bacteria, como son, el lugar de establecimiento de la cepa, tratamientos administrados con otros antibióticos y tal vez que el microorganismo sea o no una cepa de tipo hospitalario, pues todo esto determina resistencia bacteriana y variación en la acción bacteriostática y bactericida del antibiótico.

Analizando los resultados encontramos que las concentraciones bactericidas para Staphylococcus aureus

están entre 0.78 y 100 mcg/ml encontrando cepas resistentes a la máxima concentración. La acción bacteriostática fluctúa entre 0.39 y 100 mcg/ml, lo que indica la adquisición progresiva de resistencia de los microorganismos ya que es a la concentración de 50 mcg/ml donde se efectúa en mayor proporción la actividad bactericida y bacteriostática.

En el caso de Escherichia coli, la actividad bactericida está determinada en un porcentaje más alto y, a la mayor concentración para la actividad bacteriostática, el mayor porcentaje corresponde a la concentración de 50 mcg/ml.

En resumen, estas determinaciones de la acción bactericida y bacteriostática sugieren una terapia a concentraciones más bien altas, aunque hay que tomar en cuenta el lugar de la infección sobre todo cuando se trata de enterobacterias que adquieren fácilmente resistencia por presentar ya el plásmido o factor de resistencia (R).

CONCLUSIONES

1) El empleo de la técnica de dilución seriada de un antibiótico, permite determinar la concentración bacteriostática y bactericida de gentamicina (presentación comercial sulfato de gentamicina "Garamicina") frente a Staphylococcus aureus y Escherichia coli, provenientes de diversos tipos de muestras.

2) El medio de cultivo caldo Mueller-Hinton, es el más indicado para las pruebas de susceptibilidad al no presentar el fenómeno de antagonismo.

3) La turbidez del inóculo se determina mediante la medición del A_{620} , empleándose esta técnica debido a que al utilizar el sulfato de bario para estandarizar la suspensión bacteriana, se obtiene una concentración muy elevada lo que impide la medición.

4) Es importante para la práctica médica determinar la acción del antibiótico sobre diferentes cepas bacterianas.

5) El uso masivo de gentamicina ha alterado la sensibilidad de las poblaciones bacterianas. Por consecuencia, se requieren concentraciones cada vez más elevadas para que el antibiótico tenga acción bacteriostática y bactericida frente a los agentes bacterianos.

APENDICE

Caldo infusión de carne

Preparación:

a) Poner 500 g de carne de res molida en 1,000 ml de agua y dejar macerar en el refrigerador entre 12 y 24 horas.

b) Espumar la grasa, filtrar por medio de gasa y hervir vigorosamente durante 30 minutos.

c) Restaurar el volumen perdido de agua.

d) Filtrar a través de gasa para separar las partículas de carne y dejar que sedimenten.

e) A cada 1,000 ml de infusión añadir:

Peptona de carne 10 g

Cloruro de sodio 5 g

f) Calentar para disolver la peptona y ajustar el pH de 7.6 a 7.8.

g) Hervir durante 30 minutos, dejar enfriar a unos 30°C, filtrar a través de papel filtro, distribuir en matraces erlenmeyer y esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

Caldo Mueller-Hinton

Preparación:

Peptona de caseína 1.75 g

Almidón 0.15 g

Infusión de carne 100 ml

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

Caldo cerebro-corazón, caldo de manitol rojo de fenol, agar con eosina y azul de metileno, agar gelosa-sangre, agar con sal y manitol, caldo de urea, medio de Kligler, medio de SIM. (7)

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bailey W.R. and Scott E.G.
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
3era. Edición.
Editorial Médica Panamericana (1973)
- 2) Bartlett R.C. and Mazens M.
"Analytical Variability in the Single Disk
Antimicrobial Susceptibility Test"
Am. J. Clin. Pathol. 59/376-383 (1973)
- 3) Barry A.L.
THE ANTIMICROBIC SUSCEPTIBILITY TEST:
PRINCIPLES AND PRACTICES
Lea & Febiger, Philadelphia (1976)
- 4) Barry A.L. and Lasner R.
"In-Vitro Methods for Determining Minimal Lethal
Concentrations of Antimicrobial Agents"
Am. J. Clin. Pathol. 71/88-92 (1979)
- 5) Barry A.L., Loyce L.J., Adams A.P. and Benner E.J.
"Rapid Determination of Antimicrobial Susceptibi-
lity for Urgent Clinical Situations"
Am. J. Clin. Pathol. 59/693-699 (1973)
- 6) Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. and Turck M.
"Antibiotic susceptibility testing by a standar-
dized single disk method"
Am. J. Clin. Pathol. 36/3/493-496 (1966)
- 7) BBL (Baltimore Biological Laboratories)
Manual de Procedimientos de Laboratorio y de
Productos (1974)
- 8) Benveniste R. and Davies J.
"Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria"
Ann. Rev. Biochem. 42/471-506 (1973)

- 9) Benveniste R. and Davies J.
 "R-factor mediated gentamicin resistance; A new enzyme which modifies aminoglycoside antibiotics"
FEBS Lett. 14/5/293-296 (1971)
- 10) Bergey D.H.
 BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY
 Eighth Edition.
 The Williams and Wilkins, Company.
 Baltimore (1974)
- 11) Blazevic D.J., Koepcke M.H. and Matsen J.M.
 "Quality control testing with the disk antibiotic susceptibility test of Bauer-Kirby-Sherris-Turck"
Am. J. Clin. Pathol. 57/592-597 (1972)
- 12) Branch A., Starkey D.H. and Power E.E.
 "Diversifications in the Tube Dilution Test for Antibiotic Sensitivity of microorganisms"
App. Microbiol. 13/3/469-472 (1965)
- 13) Boyd R. and Bryan N.G.
 BASIC MEDICAL MICROBIOLOGY
 Little, Brown and Company.
 Boston (1977)
- 14) Bryan A.H., Bryan C.A. and Bryan C.G.
 BACTERIOLOGIA: PRINCIPIOS Y PRACTICAS
 Cía. Editorial Continental S.A. de C.V.
 México (1982)
- 15) Bryant M.C.
 ANTIBIOTICOS Y SU CONTROL MEDIANTE EL LABORATORIO
 Editorial "El Manual Moderno" S.A. de C.V.
 México (1976)
- 16) Carpenter P.L.
 MICROBIOLOGIA
 2da. edición en español
 Nueva editorial Interamericana S.A. de C.V.
 México (1982)

- 17) Collee J.B. and Path F.R.C.
MICROBIOLOGIA MEDICA APLICADA
H. Blume Ediciones.
Rosario 17 Madrid 5 (1978)
- 18) Cooper D.
"Recent Development in the chemistry of Gentamicin"
J. Infect. Dis. 136/3/342-350 (1971)
- 19) Damper P.D. and Epstein W.
"Role of Membrane Potential in Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics"
Antimicrob. Agents Chemother. 20/6/803-808 (1981)
- 20) Davies J. and Davies B.D.
"Misreading of Ribonucleic Acid Code Words Induced by Aminoglycoside Antibiotics"
J. Biol. Chem. 243/12/3312-3316 (1968)
- 21) Davies J., Gorini L. and Davies B.D.
"Misreading of RNA codewords induced by Aminoglycoside Antibiotics"
Molec. Pharmacol. 1/93-106 (1965)
- 22) Davies J. and Kass E.H.
"Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics"
J. Infect. Dis. 124 suppl/7S-10S (1971)
- 23) Davies J.E. and Rownd R.
"Transmissible Multiple Drug, Resistance in Enterobacteriaceae"
Science 176/758-768 (1972)
- 24) Dowling H.
"Gentamicin; Laboratory and Clinical Experience in México"
J. Infect. Dis. 119/443-452 (1969)

- 25) Escárzaga E.
 "Gentamicin; Laboratory and Clinical Experience
 in Mexico from the Hospital General SSA. Insti-
 tuto de Investigaciones Médicas"
J. Infect. Dis. 119/443-447 (1969)
- 26) Finland M.
 "The Symposium on Gentamicin"
J. Infect. Dis. 136/3/537-540 (1971)
- 27) Goldstein A., Aronow L. and Kolman S.M.
 PRINCIPLES OF DRUG ACTION; THE BASIS OF PHARMA-
 COLOGY
 Second edition.
 A wiley Biomedical-Health Publication (1974)
- 28) Goodman L.S. and Gilman A.
 BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA
 4ta. edición. Editorial Interamericana (1974)
- 29) Hahn F.E., Ciak J., Wolfe A.D., Hartman R.E.,
 Allison J.L. and Hartman R.S.
 "Studies on the mode of action streptomycin"
Biochem. Biophys. Acta 61/741-749 (1962)
- 30) Haselkorn R. and Rothman-Denes L.B.
 "Protein Synthesis"
Ann. Rev. Biochem. 42/397-438 (1973)
- 31) Heller A.H.
 "Effect of sodium chloride on Gentamicin
 Accumulation by Escherichia coli; Correlation with
 bacterial growth and inability"
J. Antibiotic. 33/6/604-613 (1980)
- 32) Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg E.A.
 MICROBIOLOGIA MEDICA
 Decima edición.
 Editorial "El Manual Moderno" S.A. de C.V.
 México (1983)

- 33) Kumate J.
 ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPICOS
 2da. edición.
 Editorial Francisco Méndez Cervantes.
 México (1981)
- 34) Lehninger A.L.
 BIOQUIMICA
 2da. edición. Editorial Omega, S.A.
 Barcelona (1978)
- 35) Litter M.
 FARMACOLOGIA; EXPERIMENTAL Y CLINICA
 5ta. edición. Editorial El Ateneo.
 Buenos Aires (1977)
- 36) Luedemann G. and Brodsky B.
 "Taxonomy of Gentamicin producing Micromonospora"
Antimicrob. Agents Chemother. 1/116-123 (1963)
- 37) McPaddin J.F.
 PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE
 BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA
 Editorial Médica Panamericana, S.A. (1980)
- 38) Meyer H.F. and Jawetz E.
 MANUAL DE FARMACOLOGIA CLINICA
 Editorial "El Manual Moderno" S.A. de C.V. (1977)
- 39) Milanesi G. and Ciferri O.
 "Studies on the Mechanism of Action of Gentamicin
 Effect on Protein Synthesis in Cell-Free Extracts
 of Escherichia coli"
Biochemistry 5/3926-3935 (1966)
- 40) Newton B.A.
 "Mechanisms of Antibiotic Action"
Ann. Rev. Microbiol. 19/209-233 (1965)

- 41) Norris J.R. and Richmond M.H.A.
 ESSAYS IN MICROBIOLOGY
 Editorial John Wiley & Sons Inc.
 N. Y. (1978)
- 42) Oliver P.L.
 FUNDAMENTOS DE GENETICA
 14a. edición. Editorial McGraw-Hill S.A. de C.V.
 México (1977)
- 43) Pelczar M.L. Jr., Reid R.D. and Chan E.C.S.
 MICROBIOLOGIA
 4ta. edición (segunda edición en español)
 McGraw-Hill S.A. de C.V. México (1982)
- 44) Rose S.B. and Berky J.A.
 "A quality control system for disk antibiotic
 testing"
Am. J. Clin. Pathol. 48/2/200-215 (1967)
- 45) Sanders C.C. and Sanders E.Jr.
 "Effects of Procedural Variations on the Activi-
 ty of Aminoglycoside In Vitro"
Am. J. Clin. Pathol. 63/438-445 (1975)
- 46) Sarre S.G. and Hahn F.E.
 "Mode of action of gentamicin"
Trans. N.Y. Acad. Sci. 29/575-578 (1967)
- 47) Smith D.H.
 "R-factors for aminoglycoside antibiotic from The
 Departamente of Pediatrics Harvard Medical School
 an Departamente of Medicine, Children Hospital
 Boston, Massachusetts"
J. Infect. Dis. 119/378-387 (1969)
- 48) Stryer L.
 BIOQUIMICA
 Editorial Reverté, S.A. España (1979)

- 49) Von H.O. y Plembel M.
ANTIBIOTICOS AMINOGLUCOSIDOS
 4ta. edición.
 Editorial George Thieme (1975)
- 50) Weisbren B.A., Carr C. and Dunnette J.
 "The tube dilution method of determining bacterial
 sensitivity to an antibiotics"
Am. J. Clin. Pathol. 21/884-891 (1951)
- 51) Waitz L.A. and Weinstein M.J.
 "Recent Microbiological studies with gentamicin"
J. Infect. Dis. 136/3/355-360 (1971)
- 52) Weinstein J. Drube C.G.
 "Microbiologic studies related to bacterial
 Resistance to gentamicin"
J. Infect. Dis. 124 suppl/11S-17S (1971)
- 53) Weinstein M.J. and Luedemann G.M.
 "Gentamicin, A new Broad spectrum Antibiotic
 Complex"
Antimicrob. Agents Chemother. 1/1-7 (1963)
- 54) Weinstein R. and Nathan C.
 "Endemic Aminoglycoside Resistance in Gram
 Negative Bacilli"
J. Infect. Dis. 141/3/338-345 (1980)
- 55) Weisblum B. and Davies J.
 "Antibiotic Inhibitors of the Bacterial Ribosome"
Bacteriol. Rev. 32/4/493-528 (1968)
- 56) White A.
 "In Vitro activity of gentamicin"
Antimicrob. Agents Chemother. 1/17-19 (1963)