

2ij. 29



Universidad Nacional Autónoma de México

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"Zaragoza"**

**EVALUACION DE LA RESISTENCIA A LOS
ANTIBIOTICOS DE BACTERIAS GRAM
POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS AISLADAS
EN EL HOSP. GENERAL C. M. LA RAZA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

XICOTENCATL RODRIGUEZ REYES

MEXICO, D. F.

1986.





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.

I N D I C E

	page.
INTRODUCCION	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
HIPOTESIS	9
OBJETIVOS	10
GENERALIDADES	32
MATERIALES Y METODOS	44
RESULTADOS	54
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	65

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION.

Uno de los problemas terapéuticos en el empleo de antimicrobianos de gran importancia, en las últimas décadas es el fracaso en el tratamiento de los procesos infecciosos, que con frecuencia respondían al mismo adecuadamente, esto no significa una elección errónea, sino la causa es debida al uso indiscriminado de los antimicrobianos originando un aumento de resistencia en las bacterias gram positivas y gram negativas.(23).

Con la idea de solucionar este problema, se introducen a la clínica nuevos antibióticos sin llegar al resultado esperado, pues luego aparecen cepas resistentes al mismo(15) Siendo necesario contar con pruebas de susceptibilidad - que reporten mayor confiabilidad y efectividad en los tratamientos.

Por lo anterior se evaluó en el Hospital General C.M. la Raza la resistencia para los microorganismos como: enterobacterias, Pseudomonas, Staphylococcus aureus y Haemophilus influenzae a diversos antimicrobianos, seleccionados como antibióticos de primera elección, por presentar un porcentaje de resistencia menor al 10%.

En base a este estudio "in vitro" se propone la realización periódica de estos exámenes, para detectar los incrementos en el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos de uso habitual e incrementar el empleo de nuevos antibióticos de aparición en el comercio, como otra alternativa en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

F U N D A M E N T A C I O N

D E L

T E M A

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.

El uso y abuso de los antimicrobianos, ha sido un factor-determinante en la aparición e incremento de la resistencia bacteriana. Cada vez que se introduce un nuevo antibiótico en la clínica aparecen cepas resistentes con mayor o menor rapidez. Este fenómeno ocurre principalmente por una selección que hace el antimicrobiano, facilitando la proliferación de clonas resistentes e incrementar en forma importante el intercambio de material genético responsable entre las bacterias(10).

Este intercambio genético es la causa más importante de la resistencia clínica a los antimicrobianos. El DNA extracromosómico, es el responsable de esta resistencia, puede reproducirse dentro de las bacterias y luego extenderse a otras por transducción o conjugación.

Cuando ocurre una alteración en el DNA cromosómico se produce una mutación, estos cambios llevan a la formación de enzimas y otras proteínas que inactivan fármacos o hacen difícil e imposible su interacción.

La transducción es un tipo de transferencia genética donde el DNA de una bacteria se introduce en otras por infección bacteriófaga, esta transmisión de resistencia entre bacterias se llama resistencia infecciosa.

La conjugación es otro proceso de transferencia de genes de una bacteria a otra, transfiriendo resistencia a uno o varios antibióticos de la misma o diferente especie; durante el apareamiento, aún en ausencia del antimicrobiano este intercambio genético es la causa más importante de -

resistencia epidémica a múltiples fármacos(2).

Los elementos genéticos que controlan la resistencia infecciosa a los fármacos constituyen una forma de DNA que se conoce como plásmidos. Estos no son parte del gran cromosoma bacteriano circular, sino que existen como pequeñas moléculas de DNA capaces de reproducirse en forma independiente.

Los factores de resistencia en las bacterias gram negativas, se denominan factores R.

Ellos se encuentran principalmente en las bacterias intestinales, en especial Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Salmonella, Shigella, Proteus y Pseudomonas. Estos pueden ser transferidos de una especie bacteriana a otra sin importar su patogenicidad, se pueden transferir de E. coli resistente a Salmonella o Shigella dentro del intestino humano.(2)

También se ha encontrado transferencia de resistencia de Escherichia coli a Haemophilus influenzae por conjugación (27).

Las bacterias que contienen factores R constituyen un serio problema en la quimioterapia de enfermedades como fiebre tifoidea y disentería bacilar, puesto que retienen su virulencia(2).

Las enterobacterias y Pseudomonas son agentes etiológicos de una gran diversidad de infecciones localizadas y sistémicas, presentan una amplia heterogeneidad de resistencia a los antimicrobianos. En tanto Escherichia coli esta asociada con septicemias, infecciones urinarias, neumonías e infecciones de heridas que exhiben hemolisinas. Las Kleb-

siellas se les encuentra en infecciones sistémicas (bacteriemia, neumonías, septicemias y localizaciones diversas), afectando fundamentalmente a los lactantes y recién nacidos.

Las Pseudomonas están localizadas en las heridas efectuadas en pacientes hospitalizados, y se ha incrementado en los pacientes ya sea por edad avanzada, inmunopresión, inmunodeficiencia, tratamientos agresivos, radiaciones, pacientes sujetos a cirugía mayor y en general es frecuente en venoclisis, transfusiones, endoscopia y manipulación "invasiva" (11).

Staphylococcus aureus, su principal forma de contagio es por contacto directo con pacientes infectados y la puerta de entrada es la piel, como impétigo, abscesos y furúnculos; también producen infecciones graves como celulitis, osteomielitis, neumonías, endocarditis y meningocelulitis. Así mismo es responsable de infecciones intrahospitalarias y los principales factores predisponentes son la aplicación de venoclisis y catéteres intravenosos. (6,20). Los plásmidos de penicilinasa en los Staphylococcus han creado un problema menos grave que los factores R de las bacterias gram negativas puesto que la resistencia múltiple, no se transmite por medio de dichos plásmidos.

La resistencia a penicilina y cefalosporina, se debe a enzimas hidrolíticas que abren el anillo beta-lactámico, presentándose dos tipos generales.

1.- una actúa contra penicilina exclusivamente.

2.- otra ataca penicilina y cefalosporina (2,12).

Las B-lactamasa de las bacterias positivas son extracelu-

lares, con alta afinidad por el sustrato. Contrariamente a las bacterias gram negativas, se producen en pequeñas cantidades y tienen una menor afinidad por el sustrato. La penicilinasa se sitúa en la membrana citoplásmica y destruye al antibiótico al atravesar la pared celular(5). Haemophilus influenzae es responsable de diversas enfermedades humanas, desde la infección respiratoria, artritis-meningitis, aunque causa también celulitis, neumonía, epiglottitis y otitis media aguda. Su resistencia a la ampicilina y penicilina es por adquisición de plásmidos que le confieren a estos microorganismos la información para sintetizar la enzima beta-lactamasa, el porcentaje de resistencia para la ampicilina varia entre 6 a 23% (13,20,21).

P L A N T E A M I E N T O

D E L

P R O B L E M A

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad el abuso en el empleo de los antimicrobianos, tanto en hospitales como en la comunidad, se ve reflejado en los numerosos estudios que muestran el aumento de resistencia a los antimicrobianos (18).

En este trabajo se determinará la resistencia actual de los microorganismos aislados en el Hospital General C.M. la Raza, así como el desarrollo del método de dilución en agar.

Con este método se obtendrán las susceptibilidades bacterianas, su concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) y el porcentaje de resistencia. Todo lo anterior en base a la concentración máxima que alcanza el antibiótico en los líquidos corporales. El método de difusión en agar se empleará en forma comparativa.

Ventajas y desventajas de ambos métodos.

Método de difusión en agar.

Ventajas.

a.- este método, tal como se emplea normalmente, es una prueba cualitativa que ubica a los microorganismos en la categoría de: sensible, intermedio o resistente.

b.- el método realizado en forma correcta, es confiable a los resultados y comparable a los métodos de dilución en tubo o agar.

c.- generalmente el método es aplicable a los microorganismos de crecimiento rápido como son: enterobacterias y Staphylococcus.

d.- como método de rutina es reproducible y confiable.
(13).

Desventajas.

Si no se realizan las indicaciones correctas, como tamaño del inóculo, medición incorrecta de los halos de inhibición y su interpretación de acuerdo a las tablas establecidas, la sensibilidad será errónea.

a.- se requiere de más cantidad de material para determinar la sensibilidad en una especie bacteriana.

b.- aumentando así el costo, al aumentar la cantidad de material, medio de cultivo y sensibiliscos.

c.- requiriéndose más tiempo entre más microorganismos se procesen.

d.- es inaplicable en muchos microorganismos de crecimiento lento y la susceptibilidad será inexacta.

Método de dilución en agar (replicador de Steers).

Ventajas.

a.- en una placa pueden probarse 32 cepas diferentes.

b.- permite descubrir la presencia de contaminantes.

c.- se obtienen datos cuantitativos de susceptibilidad-
determinando la concentración mínima inhibitoria (C.M.I).

e.- los resultados son reproducibles en un 95 % (10).

H I P O T E S I S

HIPOTESIS.

Debido al mal uso y/o el uso indiscriminado de los antimicrobianos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, es de esperarse que la resistencia vaya en aumento en los hospitales. Dicha resistencia se presenta en los microorganismos gram positivos y bacilos gram negativos - teniendo una mayor importancia en los últimos, debido principalmente a su mecanismo de resistencia es por conjugación de plásmidos R.

O B J E T I V O S

OBJETIVOS.

1.- Determinar la resistencia, de las cepas de enterobacterias, Pseudomonas, Staphylococcus aureus y Haemophilus-influenzae, por el método de dilución en agar y difusión.

2.- Establecer el patrón de susceptibilidad para Staphylococcus aureus.

3.- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias - (C.M.I.) para las bacterias gram negativas y gram positivas.

4.- Comparar dos técnicas para la identificación de la enzima beta-lactamasa para Staphylococcus aureus.

G E N E R A L I D A D E S

ANTECEDENTES.

No todas las cepas bacterianas son por igual sensibles a un antibiótico. El rango en que el microorganismo es inhibido por un antibiótico, es llamado espectro bacteriano.

Una población sensible a un antibiótico presenta las formas de resistencia que pueden producir cambios genéticos, como mutación o transmisión de genes entre bacterias.

Dentro de una especie bacteriana se encuentran cepas sensibles y resistentes.

Con la introducción a la clínica de la penicilina el porcentaje de resistencia para el Staphylococcus se incrementó gradualmente para 1946 era 5%. En 1950 fué 43.5%.

El mismo año la penicilina fue reemplazada como otros antibióticos, y posteriormente la fracción de resistencia decreció, en 1953 a 22.3%.

A partir de 1946 una serie de derivados de sulfonamidas-- se introdujeron en Japón, para tratar la disentería mostrándose, altamente eficaces durante los primeros años, reduciendo sensiblemente la enfermedad. Sin embargo después de 1949, el amplio uso de las sulfonamidas, registró incrementos en la incidencia de la disentería por Shigellas resistentes al fármaco.

El empleo sucesivo de nuevos antimicrobianos (estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina), para el tratamiento de la disentería provocada por Shigellas resistentes a las sulfonamidas, dieron inicialmente excelente resultado, reducción de la frecuencia de la enfermedad; después de cuatro años se aislaron cepas de Shigellas--

resistentes a estos antimicrobianos. A partir de 1957, se registró un notable aumento del número de pacientes afectados de disentería con una constante en la tasa de mortalidad.

Cepas de Shigella resistentes a la tetraciclina o estreptomycin fueron aislados a partir de 1953. Fué hasta 1955 cuando se llegó al aislamiento de cepas portadoras de resistencia múltiple (16).

Otros casos de resistencia múltiple fueron reportados por el Hospital de Boston en 1965 (sulfonamidas, estreptomycin, tetraciclina y cloranfenicol). Para 1967 la resistencia múltiple llegaba a un 50% (26).

En los estudios realizados en el Hospital de Infectología del C.M. la Raza en los años de 1982 y 1983, se reportaron los siguientes porcentajes de resistencia para Staphylococcus aureus; ampicilina 80 y 61%, penicilina 84 y 83%, - eritromicina 14 y 19%, gentamicina 9 y 11%, dicloxacilina 3 y 15.4%, cefalosporina 1 y 7.1%.

En el caso de las bacterias gram negativas la resistencia para E.coli a los siguientes antimicrobianos fué; ampicilina 74 y 78%, carbenicilina 69 y 70.5%, gentamicina 14 y 20.6%, para amikacina sólo 0.0% en 1982.

Para K.pneumoniae: los porcentajes de resistencia son: ampicilina 97 y 96%, carbenicilina 92 y 90%, gentamicina 30 y 33% y amikacina en 1982 fué del 27%.

Proteus mirabilis; ampicilina 58.6%, carbenicilina 55 y - 47.6%, gentamicina 27 y 32.5% y amikacina para el año de 1982 fué 9.0%. Salmonella typhi se obtuvo 0.0% de resistencia para: ampicilina, amikacina, carbenicilina, cloran

fenicol, gentamicina y para el año de 1983 fué ampicilina - 1.3%, carbenicilina 6.4%, cloranfenicol 0.8% y gentamicina - 0.6%. Salmonella spp son: ampicilina 59% y 31.1%, carbenicilina 39 y 38%, cloranfenicol 42 y 23%, gentamicina 21 y 13% y amikacina sólo se probó para 1982 con 0.0%.

Pseudomonas aeruginosa su porcentaje de resistencia son: ampicilina 98 y 100%, carbenicilina 66 y 43%, cloranfenicol - 90 y 93%, gentamicina 30 y 41%. (3,18).

En estudio de sensibilidad a 11 antimicrobianos por el método de dilución en agar se encontró lo siguiente: para cepas aisladas de hemocultivos, coprocultivos y exudados diversos Klebsiella fue más sensible a la amikacina; E.coli fué generalmente sensible a gentamicina, amikacina y trimetoprim/ - sulfametoxazol, y Pseudomonas a carbenicilina y amikacina, - mientras que, Proteus mirabilis y Proteus indol positivos - fueron generalmente sensibles sólo a gentamicina y amikacina.

Salmonella enteritidis y Shigella mostraron alrededor de -- 60% de resistencia a ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim/ sulfametoxazol de 30 a 40%. En los urocultivos E.coli y Klebsiella fueron sensibles habitualmente al ác. nalidíxico, nitrofurantoina, gentamicina, amikacina y TM/SZ(10).

TRANSFERENCIA GENETICA.

En las bacterias existen tres tipos de mecanismos de transferencia genética que son los siguientes.

a.- transformación: involucra la transferencia de una fracción del DNA del medio ambiente a la bacteria.

b.- transducción: es la transferencia de uno o más genes de una bacteria donadora resistente, a una receptora sensible mediante la intervención de un bacteriófago, esta puede ser de dos formas: la generalizada implica la transferencia de todos los genes y la restringida sólo algunos genes. Estos dos mecanismos son responsables de la resistencia en los cocos gram positivos Staphylococcus.

c.- conjugación: requiere del contacto de una bacteria donadora y una bacteria receptora, donde el material genético es transferido através de un canal que une a las dos bacterias llamado pilo. Esta más relacionado con los bacilos gram negativos. enterobacterias.

GENETICA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

Resistencia intrínseca:

El término resistencia intrínseca, es empleado para indicar la resistencia natural al antimicrobiano para las bacterias de una especie. Esta resistencia, es evidente al inicio del empleo de antimicrobianos.

La resistencia beta-lactamasa a la cefalosporina de especies de enterobacterias y resistencia a la penicilina de Pseudomonas aeruginosa es debido en parte, a la especificidad cromosómica de la B-lactamasa. Es probable que casi toda la resistencia B-lactamasa sea intrínseca, en parte por la actividad de la misma.

Resistencia por Mutación:

La mutación espontánea a la resistencia a fármacos es infrecuente, ocurriendo por lo general sólo en 1 de 10 millones a un billón de células bacterianas (2).

En general, la resistencia producida por mutación es diferente a la asociada por plásmidos; por ser su mecanismo de tipo recesivo. El resultado de la mutación es instantáneo produciendo un gene que reduce o elimina la afinidad con el fármaco. Después el sitio blanco del antibiótico, es afectado o el transporte de proteínas. Otro posible efecto podría ser el incremento total de sitios blancos o la reducción necesaria de la célula para un metabolito en particular.

En las bacterias haploides sólo existe un gene funcional para una propiedad celular.

La alteración de estos, producirá la reducción en la capacidad de unión al antibiótico; y el microorganismo expresará algunos niveles de resistencia, después el fenotipo retardará las necesidades reemplazando parte o todo el gene normal por el gene defectuoso. Un ejemplo de resistencia por mutación, es cuando se elevan los niveles de estreptomicina, involucrando el gene srtA.

Esta mutación afecta la proteína S12 de la subunidad ribosomal 30S. Las mutaciones resultan en uno (o raramente dos) aminoácidos, en uno de los dos sitios de la proteína S12. La proteína retarda las funciones en el ribosoma, impidiendo la unión de la subunidad 30S con la estreptomicina.

El efecto de la mutación en la proteína S12 causa una reducción en la proporción de translación del ARN_m aunque aparentemente el error es bajo se efectúa la translación. La mutación del gene srtA puede también resultar, de una dependencia de la bacteria sobre la estreptomicina para su crecimiento.

La resistencia ocasional por mutación a los antibióticos, está limitada por el uso de los mismos, (caso de la rifamicina para una meningitis) o como resultado del uso de dos fármacos cuando alguno de ellos es empleado, como tentativa para eliminar la resistencia mutante (el tratamiento de tuberculosis con estreptomicina con uno o más antimicrobianos); en este caso la estreptomicina con un índice de mutación aproximadamente 10^{-10} y la isoniacida de 10^{-6} la posibilidad de desarrollar resistencia en ambos

antimicrobianos es sólo de 1 en 10^{16} , divisiones celulares. Esta probabilidad es tan pequeña, que el uso combinado en el tratamiento de la tuberculosis cavitaria pulmonar casi nunca es seguido por el desarrollo de resistencia alguno de estos fármacos.

La mutación involucra la adición, delección o sustitución de uno o algunos nucleótidos, que probablemente sucede durante la replicación del DNA, reparación o ambas.(4).

PLASMIDOS Y TRANSPOSONES.

La base genética de adquisición de resistencia a los antibióticos por adición de DNA en la célula bacteriana, da una nueva función celular. Dichas funciones pueden dominar la susceptibilidad de la bacteria al antimicrobiano en orden de expresar la resistencia.

- a.- modifican al antibiótico por adición de un grupo; - produciendo acetilación, fosforilación o nucleotilación.
- b.- hidrólisis del anillo beta-lactámico u organomercuriales.
- c.- representa nuevas enzimas con reducción en la afinidad del antimicrobiano.(dehidrofolato reductasa, dehidroptearato sintetasa).
- d.- metilato específico de restos adenínicos de 23S ARN.

RESISTENCIA POR PLASMIDOS.

El plásmido es DNA, puede existir como extracromosómico y reproducirse independientemente o integrarse al cromosoma bacteriano(episoma).

La resistencia de los plásmidos R, lleva de uno a más genes de resistencia al antimicrobiano. Ellos pueden ser trans --

misible en la conjugación o por transducción.

En el último de los casos, la transmisión puede ser una movilización total del plásmido por su coexistente transmisión, transducción o transformación.

La transducción de plásmidos se lleva a cabo en los Staphylococcus y otras bacterias gram positivas, presentando la única o predominante resistencia a fármacos mediada por plásmidos(4).

Los plásmidos que son conjugados, pueden sufrir disociación produciendo plásmidos separados, siendo genes conjugación - (factor transferible de resistencia) FTR y resistencia antimicrobiana (determinantes-r). La secuencia contraria -- puede ocurrir.(4).

Este fenómeno, puede presentarse en muchos tipos de bacterias, las cuales efectúan conjugación por plásmidos, esto se observa frecuentemente en los miembros de los géneros -- Salmonella y Proteus. También el gene TEM B-lactamasa que se encuentra en Pseudomonas y enterobacterias se puede transmitir a H. influenzae y Neisseria gonorrhoeae. Muchos plásmidos de E.coli no pueden ser transferidos a Pseudomonas y viceversa.(27).

Casualmente la transferencia de determinantes-r y un plásmido conjugado, no requiere la formación de moléculas que se recombinen entre 2 o más subunidades. La región de los plásmidos semejantes-F, están unidos directamente por copias repetidas una inserción continua de bases nucleótidas en su terminación (IS1), es conocido como un elemento transferible (transposón). Este puede ser transpuesto a plásmido o un bacteriófago.

La principal propiedad requerida por un plásmido, es que éste sea capaz de replicarse y segregar las sucesivas generaciones de bacterias. Los genes empleados para esta función, son genes replicación (rep). Pueden presentarse funciones diversas; incluyendo genes incompatibles (inc), transferencia (tra), fertilidad inhibida (fin), exclusión superficial o total, como también resistencia antimicrobiana.

La transferencia del factor R durante el acoplamiento depende de apéndices externos de tipo piloso, los pelos sexuales, que facilitan la transferencia de plásmidos desde las bacterias macho (dadoras) a las bacterias hembra (receptoras) que no tienen pelos. El número de determinantes-r, unidos a los PTR determina el número de antimicrobianos a los que son resistentes las bacterias. Cuando una bacteria se infecta con un factor R, las bacterias desarrollan pelos sexuales y se convierte en bacteria dadora. La competencia dadora, o sea la capacidad de transmitir resistencia por conjugación, es mayor en las bacterias que han adquirido recientemente el factor R.(2).

LOS ELEMENTOS TRANSFERIBLES.

Los elementos transferibles son fracciones de DNA, capaces de translocaciones seriadas desde una replicación a otras, preservando sus características estructurales.

La translocación no requiere del sistema de recombinación específico *recA*. Ellos ocultan características fenotípicas específicas incluyendo resistencia a los antimicrobianos, resistencia a los metales pesados, enzimas involucradas en el metabolismo de la lactosa, rafinosa, tolueno, xileno o salicilato, producción de enterotoxina antigénica superficial K88 bacteriano, genes histidina de *E. coli* K12, transposición inducible y probablemente otros muchos fenotipos.

Compresiblemente cualquier gene de un cromosoma, plásmido o virus replicón, pueden ser localizado sobre un transposón.

Los transposones pueden producir mutación, rearrreglos en el DNA, (ejemplo., deleciones e inversiones) y algunos pueden comportarse como principio de transcripción y reprimir señales. La transposición puede ser al azar o en sitios específicos del receptor replicón, estas variaciones dependen de los elementos transferibles.

Los primeros son elementos simples, compuestos de inserciones (IS) y se desconoce el código de características fenotípicas. El segundo grupo son transposones algunos de ellos contienen unidades IS en su terminación.

El tercer grupo representado por la fase *Mu* pueden actuar como un trasposón y virus libre.

Los transposones tienen ciertas características estructurales; casi todos tienen una secuencia repetida invertida de bases nucleótidas en la terminación del DNA. Las excepciones, incluyen transposones (Tn)9, Tn(Raf) y Tn(R-det)-conteniendo directamente repeticiones de IS1 terminal.

La fig (1) es un diagrama de la estructura general de un elemento transferible de DNA. Las características fenotípicas presentes, son codificadas por la secuencia del DNA -- central. Por ejemplo, el gene para la producción B-lactamasa. El Tn3 es un transposón pequeño con 38 pares de bases-repetidas invertidas en su terminación. La secuencia específica central, para TEM B-lactamasa, en adición a otros polipéptidos. Uno es un polipéptido de peso molecular de 1900 es una proteína reguladora, un sitio adyacente está codificado, por una proteína reguladora, siendo importante por su fidelidad de transposición.

En adición, un segundo polipéptido largo, de peso molecular aproximadamente 10500, impidiendo las funciones, para una deficiente transposición fenotípica.

Los estudios de delección e inserción de Tn10 muestra que las delecciones afectan la secuencia central no repetida, sin alterar la frecuencia de transposición.

Las secuencias repetidas de los elementos transferibles caen dentro de dos clases, basado en lo largo de su secuencia repetida. El primero tiene secuencia corta de 50 pares de bases o menos; por ejemplo son IS1 y Tn2.

El segundo tiene más repeticiones 700 pares de bases este-

grupo incluye Tn5, Tn9 y Tn10. Probablemente es la secuencia más corta previendo signos de reconocimiento para sitios específicos de recombinación. Las repeticiones largas, codificando funciones involucradas en la translocación.

En el proceso de la translocación Fig (1) los transposones producen una duplicación de los pares de bases 5, 9 u 11, sobre la inserción del transposón. Esto ocurre por -- dos enzimas que abren y translapan a la hebra-simple los pares de base 5, 9, 11 dependiendo del transposón; el DNA complementario es sintetizado nuevamente produciendo una secuencia repetida unida directamente para la inserción de elementos. Sobre la excisión uno de ellos es removido con el elemento transposón.

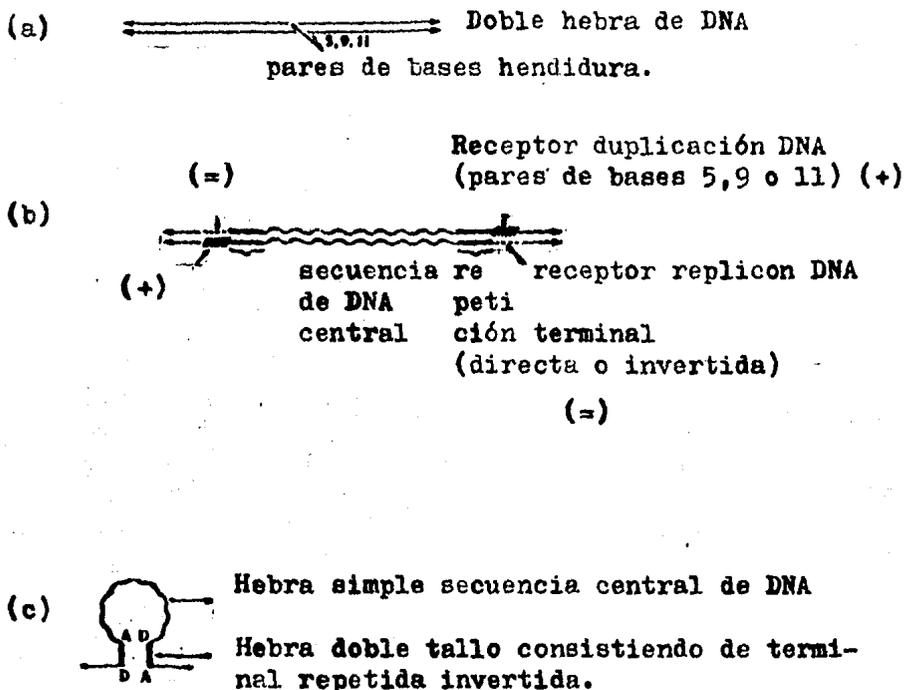


Fig 1. El proceso de transposición y la estructura general de un elemento transferible; (a) el DNA receptor inicia con una hendidura en la transposición (b) la doble hebra del replicón receptor sosteniendo un transposón, mostrando la estructura de un elemento transferible (c) Hebra simple del elemento transferible con un tallo doble hebra (horquilla o curva) produciendo la siguiente desnaturalización y desarrollo de la estructura mostrada en (b). La horquilla es rápidamente identificada por el microscopio electrónico.

El movimiento de los elementos transferibles, para un nuevo sitio el transposón insertado no pierde la forma del sitio original. Las replicaciones y transposiciones son procesos de unión o enlace.

La diversidad de plásmidos es en parte mencionada para los elementos transferibles. Un ejemplo de tres plásmidos aislados en diferentes partes del mundo, muestran el papel de los transposones, en la evolución de la resistencia a los antibióticos.

En Inglaterra R1, Alemania R6 y Japón R100 (=NR1,R222) son FII plásmidos R, los cuales llevan iguales transposones. Las estructuras de las porciones de estos plásmidos son mostradas en la Fig (2).

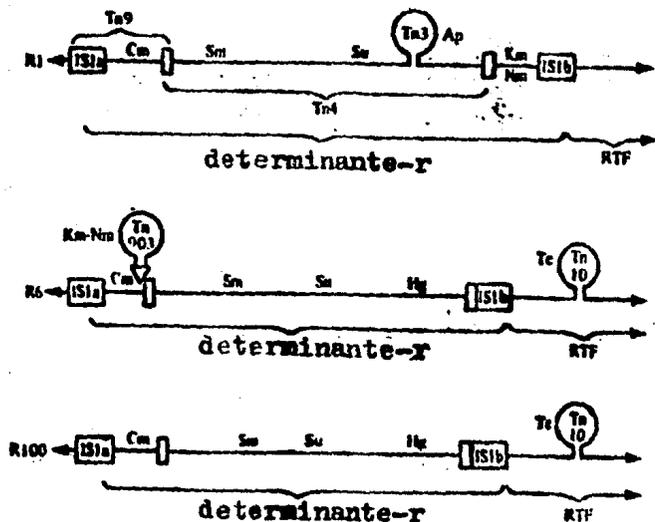


Fig. 2. Elementos transferibles en plásmidos R, R1, R6 y R100. Cm=cloranfenicol, Km-Nm=kanamicina-neomicina, Tc=tetraciclina, RTF=factor transferible de resistencia, Tn=transposón.

Los tres contienen el mismo transposón cloranfenicol (Ch) estreptomycinasa(Sm) y sulfonamida(Su). Sin embargo en R1,- Tn3 está insertado en el transposón Sm-Su y B-lactamasa - específica (ampicilina(Ap)resistente). Las combinaciones de Sm, Su y Ap se encuentran en Tn4. R1 también en un segmento codificando resistencia para neomicina(Nm)/kanamicina(Km), en éste no se conoce su transposón.

Tn903 resistencia específica Nm/Km está insertado en R6 - como se puede observar en la Fig 2.

Todo el determinante-r, es transferible. Finalmente el - FTR componente de R6 y R100 llevan, Tn10 resistencia específica a la tetraciclina.

La combinación de plásmidos transferibles entre bacterias confiere a los antimicrobianos, esto puede explicar la rápida diseminación de resistencia que está aumentando en muchos géneros bacterianos.

MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIMICROBIANOS.

I.- Inhibición de reacción metabólica.

Estas reacciones se llevan a cabo en el citoplasma del microorganismo, su toxicidad selectiva depende de la inhibición de una reacción, esencial al microorganismo infectante, pero no para el huésped. Las sulfonamidas son los fármacos que actúan de tal forma, por ser estructuras análogas al ácido para-aminobenzoico (PABA) el cual es precursor del ácido fólico. Las sulfonamidas interfieren en la síntesis del (PABA), teniendo actividad por lo tanto en microorganismos que sintetizan ácido fólico.

El trimetoprim, su mecanismo de acción es inhibir la reductasa de hidrolato a tetrahidrolato. Cuando se combina el sulfametoxazol se logra una inhibición en dos pasos de la síntesis del ácido fólico, lográndose por lo tanto un efecto sinérgico.(5,24).

II.- Acción a nivel de la pared celular.

La penicilina y cefalosporina; este grupo de antimicrobianos poseen una característica común en la estructura química, un anillo tiazolidínico unido a un anillo beta-lactámico a los que se les unen cadenas laterales que son responsables de muchas de las propiedades farmacológicas y antimicrobianas. La región activa en todos ellos está localizada en los anillos B-lactámicos. Su mecanismo de acción tiene lugar en la última fase de la síntesis de la pared celular, esto es, en el entrecruzamiento de las ca-

denas finales del mucopéptido (5).

III.- Antimicrobianos que afectan la membrana citoplasmática.

A diferencia de los inhibidores de la pared celular que son relativamente inofensivos, este grupo de antibióticos presenta **más toxicidad sin embargo sólo unos cuantos tienen aplicación clínica.** Por ejemplo; las polimixinas B y E, los polienos. Las polimixinas se unen a la superficie externa de la membrana citoplasmática, alterando su estructura y propiedades osmóticas, acción que se logra posiblemente por el desarreglo de los componentes fosfolípidos y lipopolisacáridos.

Los polienos, como la anfotericina, inhibe a los microorganismos cuyas membranas, contienen esteroides. Alterando la permeabilidad, que resulta de la unión de esteroides-polienos y la pérdida funcional y estructural de la membrana (5).

IV.- Trastornos en la síntesis de proteínas.

Los ribosomas bacterianos pueden disociarse en las subunidades 30S y 50S. La eritromicina, lincomicina, clindamicina y cloranfenicol se unen a la subunidad 50S, mientras que la tetraciclina y los aminoglucósidos como; estreptomina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina y dibekacina se unen a la subunidad 30S.

1.- Inhibición de la transcripción.

Las rifamicina.- en este grupo se encuentran compuestos formados por varios anillos aromáticos adyacentes a los que se unen un radical alifático. La rifamicina interactúa con la ARN polimerasa de una de las subunidades, bloqueando su acción catalítica. La inhibición tiene efecto en la síntesis del ARN_m y formación de proteínas (5).

2.- Inhibición de la traducción.

Los aminoglucósidos.- el efecto inhibitorio se origina por unión al ribosoma; sin embargo, es muy difícil definir el evento preciso en que se lleva a cabo los efectos tan variados que aparecen después en las células sensibles de cualquier especie, se efectúa en tres etapas:

a.- Fase no dependiente de energía.

Es una unión en la superficie bacteriana. En las bacterias gram negativas, incluye la difusión pasiva a través de los poros de la membrana externa.

b.- Fase dependiente de energía.

Comienza cuando hay suficiente antibiótico en el citoplasma para unirse a todos los ribosomas que participan activamente en la síntesis de proteínas. Las bacterias resistentes a los aminoglucósidos sólo muestran la pri

mera fase. Las cepas sensibles, además de tener una inhibición total en la tercera fase sufren una traducción e rrónea por la lectura equivocada del mensaje del ARN_m .

Ejemplos de estos aminoglucósidos: estreptomicina, neomicina, kanamicina, paromicina, gentamicina (5,25).

Tetraciclinas.

Tiene una acción inhibitoria tanto a bacterias gram negativas como gram positivas e incluso a células eucarióticas. La toxicidad selectiva se debe a la acumulación de estos compuestos en la bacteria, debido al sistema de transporte, el cual está ausente en células eucarióticas. Una vez en el interior, interfiere en la fijación de los aminoácidos ligados a su ARN_t sobre la superficie ribosomal. La resistencia que aparece en una bacteria a las tetraciclinas es compartida completamente por cualquier otra del grupo (5,25).

Cloranfenicol.

Su unión a la subunidad 50S se lleva acabo en una proporción de 1:1 entre el número de ribosomas y el número de moléculas de cloranfenicol. Su acción se origina por su fijación al sitio activo de la peptidil transferasa, impidiendo la formación del enlace peptídico de la cadena proteica en crecimiento.

Eritromicina.

Bloquea la fase de translocación, específicamente impide que el ARN_t sin un aminoácido, pero unido al sitio-A,-

se libere. De esta forma, el ARN_t queda inmovilizado o se une a un sitio adyacente que no le permite efectuar el enlace peptídico.

V.- Antimicrobianos que actúan sobre el DNA.

Se conocen varios antimicrobianos que afectan la estructura y función del DNA; sin embargo, sólo unos cuantos tienen una actividad aceptable para ser considerados en la práctica clínica. En realidad, cualquier sustancia que altere la doble hélice del DNA es potencialmente teratogénico y es capaz de afectar profundamente todas las fases del metabolismo celular.

Acido nalidíxico y ác. quinolin carboxílicos.

Su acción es reversible, se lleva a cabo sobre un componente necesario para que actúe una enzima denominada "girasa" del DNA, la cual interviene en el desenrollamiento de la molécula durante el proceso de replicación. Otro mecanismo asociado es el bloqueo de la elongación del DNA.(5).

VI.- Nitrofuranos.

Los nitrofuranos ejercen su acción antimicrobiana por la interferencia con los sistemas degradativos de los carbohidratos, primero en el ciclo anaerobio (glicólisis) y posteriormente en el ciclo de Krebs y ciclo colateral de las fosfato pentosas; la universalidad de los sistemas metabólicos involucrados explica la amplitud del espectro -

antimicrobiano y antiparasitario, así como el que las manifestaciones de toxicidad son tan amplias y abarcan prácticamente todos los órganos y sistemas.(11).

La nitrofurantoina, actúa como bacteriostático al inhibir las deshidrogenasas bacterianas. Es empleada contra cocos gram positivos y bacilos gram negativos en las vías urinarias.(14).

PROPIEDADES TERAPEUTICAS.

Las propiedades que debe tener una sustancia para poder ser empleada como agente antimicrobiano, se resumen a continuación.

- 1.- Debe destruir o prevenir la actividad del parásito sin dañar las células del huésped, o bien causarle un daño mínimo.
- 2.- Debe entrar en contacto con el parásito penetrando en las células y difundiéndose en los tejidos del huésped en concentración eficaz.
- 3.- No debe interferir los mecanismos naturales de defensa del huésped, como fagocitosis y la formación de anticuerpos.(14).

Pruebas de susceptibilidad.

La determinación de la sensibilidad de una bacteria a un antimicrobiano, "in vitro", es un procedimiento común en los laboratorios de microbiología; el resultado de estas pruebas permite la elección del antimicrobiano apropiado para la terapia de pacientes con infección bacteriana.

Las pruebas de susceptibilidad tienen por objeto establecer una correlación "in vitro" de la susceptibilidad del microorganismo con las concentraciones clínicamente factibles de un antimicrobiano, necesarias para inhibir o matar al microorganismo. (15,23).

Métodos de susceptibilidad.

- a.- Dilución seriada en tubo.
- b.- Dilución seriada en agar.
- c.- Difusión en disco de papel.
- d.- Sistema Automatizado (Autobac MSII).(8).

Factores que influyen en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

- 1.- Número de pruebas que se procesen.
- 2.- Tipo de microorganismo, sitio de aislamiento, mecanismo de patogenicidad, sensibilidad.
- 3.- Agentes antimicrobianos, características fisicoquímicas, espectro antimicrobiano, mecanismo de acción, etc.
- 4.- Huésped, estado general, vía de administración, dosis, localización de la infección.(8,13).

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

MATERIALES Y METODOS.

Tubos de ensayo	13 x 100
Tubos con tapón de rosca	13 x 100
Probetas	100ml, 250 ml.
Matraces Erlen-Meyer	1000ml, 500ml, 250ml
Vasos de precipitados	250ml, 100ml, 10ml
Matraces volumétricos	1000ml, 100ml.
Cajas de petri	
Pipetas Pasteur	
Asas de siembra bacteriológicas	
Gradillas, porta objetos, tubos capilares.	

APARATOS.

Balanza analítica. Mettler Modelo H-18
Campana de flujo laminar. Modelo H-180
Congelador Revco. Modelo US 5575B-L-A.
Aparato de Steers (replicador)
Soportes
Filtro de Millipore. Gelman. Acrodisc. Product 4184 0.45um.

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar de Hinton-Mueller
Caldo de Hinton-Mueller
Agar soya- tripticas. Agar chocolate (Levinthal)
Caldo Hinton-Mueller con glicerol al 20%.
Caldo Levinthal suplementado con factores X y V.
Factores V y X. Bioxon

REACTIVOS.

Reguladores de fosfatos

Sol. amortiguadora pH 6 y pH 8.

NaOH 10 N.

Dimetilformamida Q.P.

Acido láctico Q.P.

Etanol Q.P.

Sol. amortiguadora pH 6.4

Rojo de fenol al 0.5 %

Hidróxido de sodio 1 N.

Penicilina 1 millón de U y 10 millones de U.

Yoduro de potasio

Iodo.

Sol. de almidón al 0.4%.

ANTIBIOTICOS SALES PURAS.

Penicilina, gentamicina, amikacina, eritromicina, trimeto
prim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, cloranfenicol, ce-
falosporinas, carbenicilina, ampicilina, dicloxacilina, -
tetraciclina, nitrofuradantoína, clindamicina

Discos individuales con antibiótico.

Productos Bioclin S.A.

Amikacina	10 mcg	Lote AK 0384
Ampicilina	10 mcg	" " AM 0684
Cefalosporina	30 mcg	" " CF 0484
Eritromicina	15 mcg	" " ER 0384
Gentamicina	10 mcg	" " GE 0584

Gentamicina	10 mcg	Lote GE 0584
Penicilina	10 mcg	" " PE 0384
Ac. Nalidíxico	30 mcg	" " -----
Cloranfenicol	30 mcg	" " CL 0684
Carbenicilina	50 mcg	" " GE 0584
Dicloxacilina	1 mcg	" " DC 0484

Material Biológico.

Cepas de enterobacterias

Cepas de Pseudomonas

" " " Staphylococcus aureus

" " " Haemophilus influenzae

Cepas de referencia.

Klebsiella pneumoniae. ATCC 13883

Proteus vulgaris. ATCC 13315

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

MÉTODOS.

MÉTODO DE DIFUSION EN AGAR.

Se emplean discos de papel filtro impregnados con una cantidad precisa del antibiótico, los cuales se colocan sobre una placa con medio de cultivo, sembrada con el microorganismo aislado.

Cada antibiótico difundirá de acuerdo a sus propiedades físicoquímicas y a las del medio de cultivo, en caso de que la bacteria sea sensible a su acción, alrededor del disco se observará un halo de inhibición del crecimiento bacteriano cuyo diámetro estará en relación directa al grado de susceptibilidad del germen al antibiótico en cuestión. Para este método se recomienda utilizar solamente agar Hinton-Mueller (7).

PREPARACION DEL INCCULO.

Cuatro a cinco colonias iguales morfológicamente son tomadas del medio donde crecieron y transferidas a un tubo con 3 ó 4 ml de caldo Hinton-Mueller. Los tubos son incubados por 2 a 3 horas a 37°C para obtener un cultivo de crecimiento logarítmico (1×10^6 unidades formadoras de colonias U.F.C.). La densidad de la suspensión es estandarizada con solución estéril o caldo Hinton-Mueller a una densidad visual equivalente a un estándar de sulfato de bario (tubo # 1 de Mac-Farland) (8,14).

El Staphylococcus aureus se conservó en caldo Hinton-Mu -
ller con glicerol al 20% a - 20°C.

El tiempo de incubación del inóculo fue de 3 a 4 horas a -
37°C aproximadamente 1×10^8 U.F.C.

Haemophilus influenzae se obtuvo un cultivo en crecimiento
logarítmico empleando caldo Levinthal suplementado con
factores V y X. Se incuban en atmósfera de CO₂ al 10% du-
rante 24 horas.(14,22).

La suspensión una vez corregida no debe permanecer más de
15 a 20 minutos antes de proceder a sembrarla en las cajas
de petri. Para inocular el agar se utilizan hisopos de ma-
dera con algodón, éste se humedece con la suspensión, eli-
minando el exceso del caldo, presionando y girando el hi-
sopo sobre la pared interna del tubo, por arriba del ni-
vel del caldo.

Dejar a temperatura ambiente de 20 a 30 minutos y colocar
cada uno de los discos con pinzas presionando para que ---
tenga contacto con el inóculo, se incuban a 37°C de 18 a-
24 hrs.

INTERPRETACION.

El tamaño de cada zona de inhibición es tomado como refe-
rencia en una tabla de dos posibles categorías.

- 1.- Sensible. Cuando el halo de inhibición tiene el -
diámetro proporcional a la concentración del antibióti-
co, entonces la infección es tratable con dosis norma-
les.

2.- Resistente. Cuando el halo de inhibición presenta el diámetro menor en la relación a la concentración - del antibiótico.

DIAMETROS DE LAS ZONAS DE INHIBICION EN MILIMETROS
SEGUN EL METODO DE KIRBY-BAUER.

ANTIMICRO- BIANO.	POTENCIA mcg	R	I	S
Ampicilina (<u>S.aureus</u>)	10	20	21-28	29
Ampicilina (otros gérmenes)	10	11	12-13	14
Amikacina	10	11	12-13	14
Cefalosporina	30	14	15-17	18
Dicloxacilina	1	9	10-13	14
Eritromicina	15	13	14-17	18
Gentamicina	10	12	13-14	15
Cloranfenicol	30	12	13-17	18
Carbenicilina	50	17	18-22	23
Ac. nalidíxico	30	13	14-18	19
Penicilina (<u>S.aureus</u>)	10	20	21-28	29

R= resistente

I= intermedio

S= sensible

METODO DE DILUCION EN AGAR.

Utiliza diluciones seriadas al doble del antimicrobiano - que van de 0.25 a 250 ug/ml.

Para enterobacterias y Pseudomonas: se emplearon los siguientes antimicrobianos: ampicilina, carbenicilina, gentamicina, amikacina, cloranfenicol, bactrim (trimetoprim sulfametoxazol), ácido nalidíxico y nitrofuradantoína.

Staphylococcus aureus : ampicilina, cefalosporina, clindamicina, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina y penicilina.

Haemophilus influenzae: ampicilina, clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina y penicilina.

INTERPRETACION.

Se determina la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) (definida como la dilución más baja en ug/ml, que es capaz de inhibir o matar el crecimiento bacteriano) ; en base a este resultado se calculó el porcentaje de resistencia valorada como la concentración máxima que el antimicrobiano alcanza en sangre, esta es tomada como valor de corte (V.C.) (1.10).

El método de dilución en agar se simplificó para rutina utilizando el aparato descrito por Steers y colaboradores en 1959 con una modificación en el número de varillas inoculadoras.

- 1.- Un cabezal de aluminio con 32 varillas inoculadoras.
- 2.- Una unión de 3 patas para conectar el cabezal con mecanismo propulsor colgante consistente en una lámina triangular, pistón, cilindro y soporte.

Preparación del inóculo.

Se prepara en igual forma al método de difusión en agar. El inóculo debe compararse visualmente con un patrón de sulfato de bario (tubo # 1 de Mac-Farland) que equivale aproximadamente a 10^6 U.F.C./ml, para bacterias de crecimiento rápido y 10^8 U.F.C./ml, para bacterias de crecimiento lento como; Staphylococcus y Haemophilus.

Transcurridas la incubación, se toman 0.8 ml de cada cultivo, depositándose en los orificios correspondientes de la placa del replicador de Steers (el orden que sigue es de izquierda a derecha y al terminar una fila se pasa a siguiente). Para inocular las cajas se colocan, sobre la base del replicador y la parte superior llamada cabezal con 32 varillas inoculadoras, cada varilla inocula, 0.001 ml, el inóculo final en la superficie del agar es de 10^4 U.F.C.

Las cajas inoculadas se dejan secar de 20 a 30 minutos, luego se incuban de 18 a 24 hrs. a 37°C . Se hace la lectura si hay desarrollo o no en la concentración indicada.

Preparación de Soluciones Stock.

Las sales se disuelven de la siguiente manera: tomando en consideración la potencia biológica, su capacidad de disolución y su variación dependiendo del lote. La cantidad del antibiótico generalmente tiene un porcentaje menor al 100% de efectividad por dicho motivo se tiene que calcular. Las potencias de las soluciones Stock empleadas en este trabajo fueron de 1000 ug/ml.

un mcg del antibiótico x 1000

EPECTIVIDAD

potencia biológica

Antimicrobiano	P. Biológica en mcg	Solvente
Ampicilina	880	7.5% de Na ₂ CO ₃
Cefalosporina	915	agua
Clindamicina	784	agua
Cloranfenicol	990	metanol
Dicloxacilina	913	agua
Eritromicina	1000	etanol
Gentamicina	653.6	agua
Nitrofuradantoina	1000	1 ml de dimetilformamida
Penicilina	1000	agua
Tetraciclina	967	agua
Trimetoprim	1000	ác. láctico
Sulfametoxazol	998	NaOH 0.1 N.
Ac.nalidixico	1000	suspender en la cantidad apropiada de agua, NaOH 10 N. gota a gota hasta la disolución total.

Preparación de las placas.

Se preparan matraces con volúmenes constantes de medio de cultivo(agar Hinton-Mueller). Se calcula el volumen, necesario de Sol. Stock del antimicrobiano, para el matraz de la concentración más elevada (256 mcg/ml).

$$\text{Volumen} = \frac{\text{conc. en la placa} \times \text{vol. total del cultivo}}{\text{Potencia biológica}}$$

Posteriormente se efectuarán las diluciones necesarias hasta obtener la conc. de 0.25 mcg/ml.

Las concentraciones de prueba, en mcg/ml

Staphylococcus aureus, enterobacterias y Pseudomonas.

0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128, 256.

Haemophilus influenzae, en mcg/ml en agar chocolate.

0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0

Las cajas de petri de 10x100mm, deben contener aproximadamente 20 ml de agar con la concentración deseada del antibiótico. Una vez endurecido el agar en las placas, éstas se almacenan a 4°C.

Se ha comprobado que la actividad de los antimicrobianos en agar almacenados a 4°C durante una semana no disminuye o disminuye muy poco.

Método Iodométrico.

Agua estéril 1 ml se agrega a la penicilina G potásica - o sódica para inyección con buffer USP 1 millón de U.I. Mezclar 0.05 ml de penicilina con 1.1 ml de solución de yodo (usar dentro de las primeras horas).

Disolver 1.5 g de KI y 0.3 g de I en 100 ml de fosfato - buffer 0.1 M a pH 6.4 . La solución de yodo se guarda en frasco marrón a 4°C.

Prueba.

Una asa de microorganismos de prueba se remueve del crecimiento colonial en la superficie de una placa de agar y - se emulsiona en una gota de mezcla penicilina-yodo sobre el portaobjetos. Inmediatamente se agrega una gota de solución de almidón al 0.4%.

La prueba negativa para penicilinasas está indicada por la formación de color púrpura (azul oscuro) o lavanda durante 5 minutos.

La aparición de color blanco en 5 minutos indica una prueba positiva. Casi todas las reacciones están completas a los 30 segundos y la lectura final se hace a los 5 minutos para detectar pequeñas cantidades de penicilinasas.

Prueba acidométrica rápida para producción de B-lactamasa.

- 1.- 2 ml de solución de rojo de fenol al 0.5% se añaden a 16.6 ml de agua destilada estéril.
- 2.- Esta solución se agrega a su vez a un frasco que contiene 20 millones U.I. de penicilina G potásica o sódica.
- 3.- Hidróxido de sodio 1 N se agrega gota a gota hasta que la solución de prueba se ponga violeta(pH 8.5).
- 4.- La solución de prueba se usa inmediatamente.

Procedimiento.

Mojar un tubo capilar de 0.7-1.0 mm de diámetro en la solución de prueba y dejar que el líquido fluya por acción capilar una distancia de 1 a 2 cm.

La punta del tubo capilar se raspa ligeramente contra varias colonias, incubadas 24hrs, de modo que un tapón de bacterias llene el fondo del tubo. No debe quedar aire atrapado en la solución de prueba y las bacterias, donde las dos deben estar en contacto directo.

Los capilares llenos se incuban a temperatura ambiente en posición vertical. Esto se logra hundiendo el extremo vacío del capilar en la plastilina y dejándolo colgar resto hacia abajo.

Interpretación.

Si un microorganismo produce B-lactamasa la solución de prueba toma un color amarillo vivo en 5 a 15 minutos.

Si el microorganismo no produce B-lactamasa la solución de prueba no cambia de color o sólo llega a ser rosa pálido.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS.

En el laboratorio de microbiología del Hospital General C.M. la Raza, ha venido empleándose desde Enero de 1984 el método de dilución en agar para determinar la susceptibilidad "in vitro" a diversos antimicrobianos para los diferentes géneros bacterianos aislados de muestras biológicas enviadas al laboratorio.

Se encontró para los métodos de dilución y difusión en agar existe una correlación del 95%, lo cual nos indica la confiabilidad de ambos métodos, siempre y cuando se efectuen todas las indicaciones descritas por cada autor.

Por lo que los datos del porcentaje de resistencia a los antimicrobianos se analizaron con los valores obtenidos de la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) por el método de dilución en agar.

CUADRO I

Porcentaje de resistencia de SHIGELLAS y SALMONELLA a diferentes ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos	valor de corte ug/ml	Porcentaje de Resistencia		
		Shigella spp (60)	S. enteritidis (60)	S. typhi (8)
AMIKACINA	32	00.0	00.0	00.0
AMPICILINA	32	81.0	90.0	90.0
CARBENICILINA	64	52.2	76.0	50.0
CLORANFENICOL	16	51.0	65.0	20.0
GENTAMICINA	16	04.4	75.0	25.0
TM/02 (1/19)	32	29.0	23.3	00.0

() numero de cepas

H. G. Centro Médico
La PAZ

Se determinó el porcentaje de resistencia a 128 cepas - aisladas de coprocultivos.

Shigella spp (60 cepas), Salmonella enteritidis (60-cepas) y Salmonella typhi (8 cepas).

En el caso de Shigellas spp : amikacina 0.0%, gentamicina 4.4%, trimetoprim/sulfametoxazol 29.4%, carbenicilina 52.2% y ampicilina 81.0%.

Salmonella enteritidis: amikacina 0.0%, trimetoprim/sulfametoxazol 23.5%, cloranfenicol 65%, gentamicina y carbenicilina entre 76%, ampicilina 90.0%.

Salmonella typhi: amikacina y trimetoprim/sulfametoxazol 0.0%, cloranfenicol 20.0%, gentamicina 25.0%, carbenicilina 50.0%, ampicilina 90.0%.

CUADRO II
PRODUCTOS DIVERSOS

Porcentaje de resistencia de **ENTEROBACTERIAS** y **PSEUDOMONAS** a diferentes **ANTIBIOTICOS**

Antibióticos	valor de corte µg/ml	Porcentaje de Resistencia				
		<i>E. coli</i> (408)	<i>Klebsiella spp</i> (155)	<i>Proteus spp</i> (74)	<i>Enterobacter spp</i> (34)	<i>Pseudomonas spp</i> (77)
AMIKACINA	32	01.04	05.8	10.3	06.9	003.6
AMPICILINA	32	97.00	80.4	79.4	96.5	100.0
CARBENICILINA	64	77.00	76.8	64.7	96.5	003.6
CLORANFENICOL	16	98.90	82.6	54.4	93.1	047.3
GENTAMICINA	16	06.6	13.0	14.7	27.6	031.0
Tm/Sz (1/19)	32	27.6	23.2	29.4	39.1	030.0

() número de cepas

N. D. Centro Médico
la RAIN

De productos diversos; heridas quirúrgicas, exudados vaginales, cultivos de L.C.R., punta de catéter y otros. Se probaron 748 cepas de enterobacterias y Pseudomonas. Los porcentajes de resistencia fueron los siguientes.

Escherichia coli (408 cepas) : amikacina 1.8%, gentamicina 6.6%, trimetoprim/sulfametoxazol (Tm/Sz) 27.5%, carbenicilina 77,8%, ampicilina y cloranfenicol entre - 98 - 99.0%.

Klebsiella spp (155 cepas) : amikacina 5.8%, gentamicina 13.0%, Tm/Sz 23.2%, carbenicilina 76.8%, cloranfenicol y ampicilina entre 83.0 - 88.0%.

Proteus spp (74 cepas) : amikacina 10.3%, gentamicina 14.7%, Tm/Sz 29.4%, cloranfenicol 54.4%, carbenicilina y ampicilina entre 65.0 - 79.0%.

Enterobacter spp (34 cepas) : amikacina 6.9%, gentamicina 27.6%, cloranfenicol, carbenicilina y ampicilina - 93.0 - 96.0%.

Pseudomonas spp (77 cepas) : amikacina 3.6%, gentamicina 31.0%, cloranfenicol 67.3%, Tm/Sz 38.0%, carbenicilina y ampicilina 83.0 - 100%.

CUADRO III
URUCULTIVOS

Porcentaje de resistencia de ENTEROBACTERIAS y PSEUDOMONAS
a diferentes ANTIBIOTICOS

Antibióticos	valor de corte ug/ml	Porcentaje de Resistencia			
		E. coli (400)	Klebsiella spp (193)	Proteus spp (74)	Pseudomonas spp (34)
AMIKACINA	120	01.2	00.9	02.0	004.3
AMPICILINA	120	73.6	99.0	92.0	100.0
CARBENICILINA	256	66.6	92.5	77.5	052.0
AC. NALIDÍXICO	064	00.6	07.5	00.0	026.0
GENTAMICINA	064	07.3	16.0	18.4	043.5
NITROFURADANTOINA	256	01.4	00.9	00.0	000.7
Tm/Sz (1/19)	120	21.6	32.7	42.8	034.0

() número de cepas

H. B. Centro Médico
la RAZA

Los microorganismos probados procedentes de las vías urina-
rias fueron 871 cepas.

Escherichia coli (642 cepas) : ácido nalidíxico 0.6%,
amikacina y nitrofuradantoina entre 1.2 - 1.4%, Tm/Sz --
21.6%, carbenicilina y ampicilina 92.0 - 99.0%

Proteus spp. (64 cepas) : ácido nalidíxico y nitrofu-
radantoina 0.0%, amikacina 2.0%, gentamicina 18.4%, Tm/Sz-
42.8%, carbenicilina 77.5% y ampicilina 92.0%.

Pseudomonas spp. (36 cepas) : amikacina 4.3%, nitrofu-
radantoina 8.7%, ácido nalidíxico 26.0%, Tm/Sz 34.8%, gen-
tamicina 43.5%, carbenicilina 52.0% y ampicilina 100%.

CUADRO IV
HEMOCULTIVOS

Porcentaje de resistencia de ENTEROBACTERIAS y PSEUDOMONAS
a diferentes ANTIBIOTICOS

Antibioticos	valor de corte ug/ml	Porcentaje de Resistencia			
		E. coli (14)	K. pneumoniae (38)	S. typhi (8)	Pseudomonas spp (28)
AMIKACINA	32	00.0	000.0	00.0	000.0
AMPICILINA	32	90.5	100.0	90.0	100.0
CARBENICILINA	64	30.0	000.0	30.0	000.0
CLORANFENICOL	16	82.0	100.0	28.6	075.0
GENTAMICINA	16	00.0	030.0	00.0	005.0
Tm/Sz (1/19)	132	00.0	035.0	00.0	036.7

() numero de cepas

S. G. Centro Médico
la RITA

Para hemocultivos se ensayaron un total de 88 cepas.

Escherichia coli (14 cepas) : amikacina, gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol 0.0%, carbenicilina 30.0%, -- cloranfenicol y ampicilina entre 82.0 - 90.5%.

Klebsiella pneumoniae. (38 cepas) : amikacina 0.0%, -- gentamicina y Tm/Sz entre 30.0 - 35.0%, carbenicilina, -- cloranfenicol y ampicilina 85.0 - 100%.

Salmonella typhi. (28 cepas) : amikacina, Tm/Sz, gentamicina 0.0%, cloranfenicol 28.6%, carbenicilina 50.0% y ampicilina 90.0%.

Pseudomonas spp. (28 cepas) : amikacina 0.0%, Tm/Sz -- 36.7%, cloranfenicol, gentamicina, carbenicilina entre - 75.0 - 85.0 y ampicilina 100%.

CUADRO V

Porcentaje de resistencia de *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* y *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* a diferentes ANTIBIOTICOS

Antibióticos	valor de corte mg/l	%	
		<i>S. aureus</i> (113)	<i>H. influenzae</i> (15)
AMPICILINA	32	38.0	07.0
CEFALOSPORINA	16	09.8	---
CLINDAMICINA	00	03.5	20.0
DICLOXACILINA	16	03.5	---
ERITROMICINA	02	22.0	54.0
GENTAMICINA	02	44.3	---
PENICILINA	01	94.7	67.0
CLORANFENICOL	16	---	00.0
TETRACICLINA	02	---	20.0

() número de cepas

M. G. Centro Médico
la RAZA

Los porcentajes de resistencia para 113 cepas de Staph. aureus, aislados de exudados faríngeos y cultivos nasales, fueron los siguientes : dicloxacilina y clindamicina 3.5%, cefalosporina 9.8%, eritromicina 28.0%, ampicilina 38.0%, gentamicina 44.3% y penicilina 94.6%.

Para Haemophilus influenzae. (15 cepas) : cloranfenicol 0.0%, ampicilina 7.0%, tetraciclina y clindamicina 20.0% eritromicina 54.0% y penicilina 67.0%.

CUADRO VI

Porcentaje acumulado de las concentraciones mínimas inhibitorias (C.M.I.) para 113 cepas de *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Antimicrobianos	C. M. I. (ug/ml)											
	0.25	00.5	01.0	02.0	04.0	08.0	16.0	32.0	64.0	128	256	
AMPICILINA	00.0	00.0	02.6	04.4	05.3	05.3	40.0	62.0	79.6	089.0	100	
CEFALOSPORINA	30.0	33.4	38.0	50.4	56.5	79.6	90.2	90.2	99.0	099.0	100	
CLINDAMICINA	00.0	01.4	03.3	00.5	96.5	96.5	96.5	100.0				
DICLOXACILINA	04.0	91.1	92.0	95.3	95.5	96.5	96.5	100.0				
ERITROMICINA	75.0	77.0	77.0	78.0	79.0	79.0	83.3	088.5	95.5	095.5	100	
GENTAMICINA	10.6	25.7	38.0	55.7	57.5	70.8	90.5	093.0	95.5	095.5	100	
PENICILINA	00.0	02.6	05.3	07.0	10.6	11.5	13.3	040.0	62.0	067.0	100	

valor de corte

H. G. Centro Médico
la RAZA

Se representan los porcentajes acumulados de las (C.M.I.) para 113 cepas de Staphylococcus aureus a diferentes anti microbianos de uso en la terapéutica clínica. La línea --divisoria en todo el cuadro indica el límite para conside rar si las cepas son sensibles o resistentes. Por ejemplo el 90.2% de las cepas son inhibidas por la cefalosporina a una concentración de 16 ug/ml. La dicloxacilina 96.5% de las cepas son inhibidas a una concentración de 8.0 ug/ml, gentamicina 55.7% de las cepas son inhibidas a una concentración de 2.0 ug/ml, penicilina el 5.3% a una concentración de 1 ug/ml.

CUADRO VII

Porcentaje acumulado de la concentraciones mínimas inhibitorias de 15 cepas de HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Antimicrobianos	C. M. I. (ug/ml)									
	0.25	00.5	01.0	02.0	04.0	08.0	16.0	32.0	64.0	
AMPICILINA	06.6	06.6	20	40	53	073	093	093	100	
CLINDAMICINA	06.6	13.3	20	53	66	080	093	100		
CLORANFENICOL	46.0	53.0	80	93	93	100				
ERYTHROMICINA	13.0	20.0	26	46	86	093	100			
TETRACICLINA	60.0	60.0	73	80	80	086	093	100		
PENICILINA	06.6	13.0	33	60	80	086	093	100		

valor de corte

M. S. Centro Medico
La RAZA

Se reportan los porcentajes acumulados para 15 cepas de Haemophilus influenzae a diferentes antimicrobianos de uso en la terapéutica clínica.

La línea divisoria en todo el cuadro indica el límite - para considerar si las cepas son sensibles o resistentes.

Por ejemplo, el 93.0% de las cepas son inhibidas a una concentración de 32 ug/ml, de ampicilina y 100% de las cepas son inhibidas a una concentración de 8.0 ug/ml de cloranfenicol.

CUADRO VIII

Prueba de BETA-LACTAMASA DE 113 cepas de STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Tipo de pacientes	numero de cepas	C.M.I. < 1 ug/ml	C.M.I. > 1 ug/ml	numero de cepas positivas
HOSPITALIZADOS	93	3	90	90
CONSULTA EXTERNA	20	3	17	17
TOTAL :	113	6	107	107

También se determinó la producción de B-lactamasa por los métodos acidométrico y iodométrico. Los resultados obtenidos se analizaron por el método iodométrico, las cepas se dividieron en dos grupos, el primero de 93 pacientes hospitalizados y el segundo de 20 pacientes de consulta externa. Se encontró igual correlación entre la producción de B-lactamasa y cepas que su concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) fué mayor al valor de corte (V.C.) que es de 1 ug/ml.

CUADRO 12

C.M.I. 90 ug/ml de 113 cepas de STAPHYLOCOCCUS AUREUS
y de 15 cepas de HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Antimicrobianos	C.M.I. 90 S. aureus	C.M.I. 90 H. influenzae
AMPICILINA	120.0	16
CEFALOSPORINA	016.0	--
CLINDAMICINA	002.0	16
CLORAMFENICOL	-----	02
DICLOXACILINA	000.5	--
ERITROMICINA	032.0	08
GENTAMICINA	016.0	--
PENICILINA	120.0	16
TETRACICLINA	-----	16

H. G. Centro Medico
de RAZA

Se reporta para Staphylococcus aureus y H. influenzae sus concentraciones mínimas inhibitorias 90, que indica la concentración necesaria para inhibir o matar el 90 por ciento de las cepas expuestas a determinado antimicrobiano.

Por ejemplo, la dicloxacilina para Staph. aureus, su concentración mínima inhibitoria 90 es de 0.5 ug/ml. La ampicilina para Haemophilus influenzae su (C.M.I.90) es de 16.0 ug/ml. Como se puede notar ambas concentraciones son inferiores a su valor de corte, por lo tanto se les considera antimicrobianos eficaces en la terapéutica.

D I S C U S S I O N

DISCUSION.

Los resultados de resistencia reportados en este trabajo fueron obtenidos, empleando como método el de dilución en agar para la familia enterobacterias; Pseudomonas, Staph. aureus, Haemophilus influenzae.

Las cepas probadas en coprocultivos, en caso de Shigellas el porcentaje de resistencia fué menor para: amikacina, - gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol(Tm/Sz).

Salmonella typhi los antimicrobianos de elección son: amikacina, Tm/Sz, cloranfenicol y gentamicina.

Se puede observar el incremento de resistencia para cloranfenicol, ésto no limita su aplicación para los casos de -- salmonelosis, sin embargo es importante evaluar su sensibilidad frente a este antimicrobiano.

Salmonella enteritidis, sólo amikacina y Tm/Sz fueron eficaces.

Para los demás antimicrobianos el porcentaje de resistencia fué superior al 65% por lo que se sugiere buscar nuevas alternativas. Sin embargo es el caso de gastroenteritis no grave, se limita el empleo de antimicrobianos, debido a su evolución satisfactoria de esta infección, con una -- adecuada hidratación y dieta.

En los casos de septicemia por Salmonella enteritidis y -- Shigellas se recomienda administrar; amikacina, Tm/Sz y si la septicemia es producida por S. typhi se recomienda el -- cloranfenicol con su adecuada prueba de sensibilidad.

Para los microorganismos aislados de heridas quirúrgicas, exudados, cultivos de catéter y otros.

Se puede observar una marcada resistencia para E.coli, - Klebsiella, Proteus y Pseudomonas a la ampicilina, carbenicilina y cloranfenicol.

Los antimicrobianos de elección para estos géneros son: - amikacina, gentamicina y Tm/Sz.

Enterobacter spp: los microorganismos de elección son amikacina y gentamicina. Su porcentaje de resistencia es superior a 55% para los demás antimicrobianos.

Los microorganismos más frecuentes en las infecciones de las vías urinarias fueron: Escherichia coli y en menor porcentaje Klebsiella, Proteus y Pseudomonas, determinándose para estos géneros un incremento en el porcentaje de resistencia para ampicilina y carbenicilina.

Los antimicrobianos que se administran en este tipo de infecciones presentaron valores de resistencia aceptables, - considerándoseles de primera elección : ácido nalidixico con porcentaje de resistencia entre 0.0 - 26.0% y la nitrofuradantoina de 0.0 - 8.0%. Otra alternativa de empleo terapéutico la gentamicina con 7.3 - 18.4% y de segunda elección Tm/Sz con 21.0 - 42.8%.

Los géneros aislados de hemocultivos fueron Klebsiella, - E.coli, Pseudomonas y Salmonella typhi, presentaron un porcentaje de resistencia para ampicilina entre 90- 100%, carbenicilina 30 - 85%, cloranfenicol entre 75 - 100%.

Sólo Salmonella typhi fue de 28.6% lo que implica el empleo de cloranfenicol, con su prueba de sensibilidad.

Los antimicrobianos de elección son: amikacina, gentamicina y Tm/Ss.

Se puede notar que para Pseudomonas sólo dos antimicrobianos son de elección: amikacina y Tm/Ss. Los otros 4 presentan un porcentaje de resistencia entre el 75 - 100%.

Para Staphylococcus aureus, el porcentaje de resistencia a la penicilina fué de 94.6%, así como su relación directa con la prueba B-lactamasa por el método iodométrico.

Se encontró el siguiente porcentaje de resistencia; dicloxacilina y clindamicina de 3.5%, cefalosporina 9.8%, eritromicina 22.0% y gentamicina 44.0%, ampicilina 38%.

Los antimicrobianos de elección son: dicloxacilina y cefalosporina, empleandose principalmente el primero.

En la comparación de los dos métodos para determinar cepas B-lactamasa se encontraron más ventajas en el método iodométrico como; estabilidad en los reactivos, rapidez, sencillez, reproducibilidad y confiabilidad; pero en la práctica resulta inadecuada para S. aureus, ya que la mayoría de las cepas resultan ser B-lactamasa positivas en este caso 94.6%.

En el caso de Haemophilus influenzae las 15 cepas probadas no son representativas, por lo tanto el resultado no es del todo concluyente. Con estas cepas se encontraron los siguientes porcentajes de resistencia: cloranfenicol 0.0% ampicilina 7.0%, clindamicina y tetraciclina 20.0%, eritromicina 54.0% y penicilina 67.0%.

Los antimicrobianos de primera elección son: cloranfenicol y ampicilina. Para este último es importante llevar un control de sensibilidad, debido a que empiezan a surgir cepas de H. influenzae resistentes o en el último de los casos afectar la prueba B-lactamasa, para poder obtener un valor aproximado del aumento de resistencia y auxiliar en el diagnóstico.

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

CONCLUNSIONES.

1.- Se compararon dos métodos de sensibilidad a los antimicrobianos: difusión y dilución en agar, encontrándose las siguientes ventajas para el método dilución en agar:

a.- Se pueden determinar las concentraciones mínimas - inhibitorias en 32 cepas al mismo tiempo.

b.- Reducir el empleo de material, tiempo y costo.

c.- No depender de productos comerciales (por ejemplo los discos para sensibilidad).

d.- Se tiene veracidad de la concentración del antibiótico.

2.- Es evidente que el uso indiscriminado de los antimicrobianos ha creado un aumento en el porcentaje de resistencia para las bacterias gram negativas (enterobacterias y Pseudomonas), esto observado para los antimicrobianos: ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol y gentamicina.

3.- De acuerdo a los resultados de susceptibilidad bacteriana se determinó que los antimicrobianos de primera elección para los bacilos gram negativos facultativos, fermentadores y no fermentadores de la lactosa son: amikacina, Tm/Sz y en el caso de urocultivos se incluyen el ácido nalidíxico y la nitrofuradantoína.

4.- El género Pseudomonas es el microorganismo que con más frecuencia presenta problemas en la quimioterapia antimicrobiana, aislándose frecuentemente de productos diversos y hemocultivos. Su porcentaje de resistencia fué: amikacina de 0.0% a 3.6%, carbenicilina 80-83.6% y gentamicina - entre 31.0 a 85%.

5.- Para las bacterias gram positivas; Staphylococcus aureus, el aumento del porcentaje de resistencia para los antimicrobianos de primera elección: dicloxacilina y cefalosporina, no ha sido significativo. Los otros antimicrobianos se han mantenido en su porcentaje de resistencia, - sólo la gentamicina ha aumentado en un 20% aproximadamente.

6.- El método iodométrico para demostración de B-lactamasa es confiable comparado con el método acidométrico. Permite detectar los S. aureus penicilinasa positivos sin llegar a ser un método que ayude al tratamiento, ya que la mayoría de las cepas dan la prueba positiva. Sin embargo como se encontró una cepa de H. influenzae resistente a la ampicilina, es importante demostrar si es una cepa productora de B.lactamasa, con el fin de auxiliar en el inicio de un tratamiento rápido y eficaz.

7.- El cloranfenicol y ampicilina son los antimicrobianos de primera elección para H. influenzae.

8.- Se sugiere la integración del comité de antimicrobianos en los Hospitales que promueven la vigilancia continua en el empleo de los mismos y que prevengan la aparición de cepas microbianas resistentes por el uso indiscriminado - de los mismos y establecer normas para su empleo.

9.- En laboratorio clínico se pueden desarrollar pruebas de sensibilidad como dilución en agar, la microdilución o sistemas automatizados que den mayor confiabilidad para los tratamientos de enfermedades infecciosas.

10.- La actualización de los porcentajes de resistencia - efectuándose periódicamente (cada 6 meses) para los antimicrobianos de uso rutinario, así como la comprobación "in vitro" de la efectividad de nuevos antimicrobianos - que van surgiendo en el comercio.

Valoración y recomendaciones de ANTIBIÓTICOS de empleo rutinario

Antibióticos	Enterobacterias y Pseudomonas			S. aureus	H. influenzae
	DIVERSOS	URROCULTIVOS	MEMOCULTIVOS		
AMPICILINA	0			0	0
CARDENICILINA	0				
GENTAMICINA (G)	0	0	0	0	
AMIKACINA	0		0		
CLORAMFENICOL	0				0
BACTRIM (TN/SZ)	0	0	0		
AC. MALTIPICO	0		0		
5-ITROFURANTOINA	0	0			
ERITROMICINA				0	0
DICLOXACILINA				0	
CLINDAMICINA				0	0
CEFALOSPORINA				0	
TETRACICLINA					0
PENICILINA				0	0

- (0) Antibiótico empleado en el método de dilución en agar.
- (0) Recomendaciones en base a su bajo porcentaje de resistencia.
- (0) Se sugiere como antibiótico de 2a. elección.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Balows, A. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. 6^a. Edit. American Public Health Association Washington DC, USA. (1981).
- 2.- Braude, I. Farmacoterapia Antimicrobiana. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. (1979).
- 3.- Boletín Infecciones Intrahospitalarias. Sensibilidad y Resistencia Antimicrobiana 1983. 24, (IHSS), (1984).
- 4.- Bryan L.E. Bacterial resistance and susceptibility to chemotherapeutic agents. Published by the Press Syndicate of the University of Cambridge. (1982).
- 5.- Calderón Jaime E. Aplicación de Antibióticos y Quimioterápicos. Edit. Francisco Méndez C. Méx. (1984).
- 6.- Davies J.A., Dyas A. Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus epidermidis and Staph. aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 15, 127-128. (1985).
- 7.- Escobar Gutiérrez A. Importancia del medio de cultivo sobre el tamaño del halo de inhibición en las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Investigación Médica Internacional. 4, Supl(1), 3-8 (1977).
- 8.- Giono, S y Villa L. Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos utilizando discos de papel filtro. XII Congreso Nacional de Microbiología. ENCE. IPW. (1981).
- 9.- Giono Cereso S. Sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias aisladas a partir de hemocultivos. Rev. de Infeg tología. 6, 158-162, (1984).

- 10.- Guiscaré G.H., García P. Resistencia de enterobacterias y Pseudomonas. Recomendaciones Terapéuticas Rev.Med. IMSS. Mex. 20, 485-492, (1982).
- 11.- Kumate J. Antibióticos y Quimioterápicos. 2ª Ed. Edit Francisco Méndez C.(1981).
- 12.- Laurece R. Mc Carthy, Ph. D . B-lactamasa. Clinical Microbiology Newsletter. 2, (2), 1-3, (1980).
- 13.- Lennette H. E., Balow A. Microbiología Clínica 3ª Ed. Edit. Médica Panamericana. (1984).
- 14.- Mendoza Arredondo M.C. Comparación entre el método de dilución en placa y el método de Kirby-Bauer para susceptibilidad a los antimicrobianos. Tesis para obtener el Título de Biólogo. ENEP- Iztacala UNAM. (1983).
- 15.- Yaumans P., Parterson F., Sommers M. Infectología Clínica. 2ª Ed. Edit. Internacional. Mex.(1984).
- 16.- Rassegna Información Médica y Cultural. I .Cuaderno - Monográfico.(1973).
- 17.- Reeves S.D., Phillips I., Williams D.J. Laboratory Methods Antimicrobial Chemotherapy. Edit Churchill Livingstone Edinburgh London and New York.(1978).
- 18.- Peredo López, V. M.A., cols. Resistencia microbiana - en los hospitales del C.M. la Raza. Rev.Med. IMSS Méx 20 - 401-405. (1982).
- 19.- Steer, E. Graves E.B.S. and Riden J. An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiotics & Chemother. 9, 307-311 (1959).

- 20.- Trejo Antonio J., cols. Susceptibilidad de Staphylococcus aureus a la penicilina, dicloxacilina, gentamicina, eritromicina y rifamicina. Bol Med. Hosp. Infant. Méx. 38 (6), 45-50 (1981).
- 21.- Rotimi V.O. and Turk D.C. Transferable multiple antibiotic resistance in Haemophilus influenzae. Journal of Antimicrobiol Chemotherapy. 8, 187-192 (1981).
- 22.- Trejo Antonio J., cols. Sensibilidad de Haemophilus influenzae a la ampicilina y al cloranfenicol en niños de la ciudad de México. Bol.Med.Hosp. Infant. Méx. 38 (I) , -79-86 (1981).
- 23.- Rosas Gutiérrez J.A. Actividad Antimicrobiana contenida en los discos de papel empleados en Antibiogramas. Tesis para obtener el Título de QBP. ENCB. IPN.Méx (1976).
- 24.- Bowman W, and Rand. M. Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas. 2ª Ed. Edit. Interamericana.Méx.(1984).
- 25.- Bojalil L.F., Santoscoy G.G., Rodríguez M. Microbiología Médica. Edit. Francisco Méndez Oteo. Méx.D.F.,(1981).
- 26.- Bennett V., John Brachman S Philips. Hospital Infections. Little, Brown and Company, Boston. 1ª Ed. (1979)
- 27.- Guiney G Donal, Jr. Promiscuous Transfer of Drug Resistance in Gram-negative Bacteria. The Journal of Infectious Diseases. 149 (3), 320-329 (1984).