

Nº 290
211



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

ESTUDIO SOBRE LA EFICIENCIA DE LA COMBINACION AMOXICILINA Y ACIDO CLAVULANICO CONTRA CEPAS DE Staphylococcus, Nocardia Y Escherichia coli RESISTENTES A PENICILINAS

T E S I S
Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a
RAFAEL VILLALOBOS PEÑALOSA



Asesores: MVZ Edgar Alfonseca Silva
MVZ Roberto A. Cervantes Olivares
MVZ Graciela Tapia Pérez

México, D. F. 1992

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. MATERIALES Y METODOS	5
IV. RESULTADOS	8
V. DISCUSION	10
VI. CUADROS	14
VII. LITERATURA CITADA	26

Estudio sobre la eficiencia de la combinación amoxicilina y ácido clavulánico contra cepas de Staphylococcus, Nocardia y Escherichia coli resistentes a penicilinas.

RESUMEN

Con el fin de evaluar la eficacia del ácido clavulánico en combinación con amoxicilina contra 40 cepas de Staphylococcus, 15 cepas de Nocardia y 5 cepas de Escherichia coli, se aplicó el método de Kirby-Bauer de susceptibilidad a quimioterapéuticos por difusión en agar con las modificaciones de D'amato para Staphylococcus y E. coli y de Wallace en el caso de Nocardia, para la preparación de los inóculos. Se usaron dos concentraciones distintas de la combinación ácido clavulánico-amoxicilina y dos concentraciones de amoxicilina sola. Las cepas bacterianas se aislaron de diversas infecciones en animales domésticos y se escogieron por mostrar resistencia a penicilina en pruebas de difusión en agar. Se detectaron las cepas productoras de B-lactamasa por medio del método rápido acidométrico y se realizó una comparación del efecto de las diferentes concentraciones sobre las cepas productoras y las no productoras de B-lactamasa. Se obtuvieron los resultados siguientes: con el método de Kirby-Bauer se presentaron los halos de inhibición para cada cepa y concentración. Con el método rápido acidométrico se obtuvieron las cepas elaboradoras de B-lactamasa, que fueron 66.6 % de las cepas (70 % de Staphylococcus, 73 % de Nocardia y 20 % de E. coli). En general, la combinación ácido clavulánico (10 µg) y amoxicilina (20 µg) (conc. A), mostró halos de inhibición mas amplios que las otras concentraciones, la siguiente fue amoxicilina sola a 25 µg (conc. B). La combinación de ácido clavulánico (1 µg) y amoxicilina (2 µg) (conc. C) presentó respuesta muy cercana a la concentración anterior. La menor efectividad la tuvo la amoxicilina sola a 2 µg (conc. D). El género bacteriano que resultó mas sensible fue Staphylococcus, seguido de E. coli y finalmente Nocardia. Staphylococcus presentó la mejor respuesta en todas las concentraciones, mientras que E. coli a las concentraciones B y C y Nocardia a A y D. Se encontró que para Staphylococcus los efectos B-lactamasa y la interacción B-lactamasa-agente quimioterapéutico no fueron significativos pero el agente quimioterapéutico solo si lo fue. Mientras que para Nocardia y E. coli si fueron significativos. Esto indica los efectos que influyen en el resultado del estudio. A través del método de Duncan se obtuvieron los rangos de sensibilidad de cada género a las diferentes concentraciones, las cuales se dividieron en cepas susceptibles, intermedias y resistentes al agente quimioterapéutico.

INTRODUCCION

Antes de la aparición de los antibióticos los tratamientos de las infecciones eran deficientes, pero al surgir la penicilina en los años 40 hubo un cambio radical a esa situación, sin embargo, su eficiencia fue corta ya que después de algunos años se anunció la presencia de cepas resistentes a la penicilina encontrándose que el 60 % de las cepas aisladas lo eran, creándose microorganismos con un espectro amplio de resistencia y con habilidad de diseminarse. Con la introducción de penicilinas semisintéticas vino un declive en la aparición de resistencia durante los años 60 pero a principios de 1970 se aislaron cepas resistentes a penicilinas semisintéticas, la mayoría de las cuales producían la enzima B-lactamasa. A finales de los 70 apareció un inhibidor de B-lactamasas que se aisló del Streptomyces clavuligerus y se le llamó ácido clavulánico (26,30,32).

En México es frecuente el uso de quimioterapéuticos en zootecnia y en clínica sin el debido control, por lo que es común la resistencia bacteriana, causada por factores químicos del medio, presión de selección, selección de plásmidos de resistencia o por la producción de enzimas como la B-lactamasa que hidroliza a las penicilinas simples y de amplio espectro. La aparición espontánea de bacterias mutantes resistentes a cierto antibiótico pueden generarse de manera experimental con una frecuencia de 10^{-6} a 10^{-8} por célula y se asume que eventos análogos ocurren naturalmente en las poblaciones para crear organismos resistentes (2,11,15,22,26).

La correlación de resistencia bacteriana con la producción de B-lactamasa se reportó por primera vez en 1944. La resistencia a la penicilina tiene 3 mecanismos de acción, el primero es su inactivación por medio de la hidrólisis del anillo B-lactámico del antibiótico, el segundo, que tiene la misma efectividad contra penicilinas sensibles y resistentes a B-lactamasa, es por medio de una resistencia intrínseca que disminuye la afinidad o la cantidad de proteínas afines a la penicilina. El tercero es de tolerancia al efecto bactericida de los antibióticos B-lactámicos, ya que después de la síntesis de la pared celular bacteriana, el antibiótico provoca una lisis de esta a través de una enzima autolítica asociada a la pared, encontrándose reducida esta actividad autolítica en los microorganismos tolerantes (26). Entre las bacterias que han desarrollado mayor resistencia a los antimicrobianos se encuentra el género Staphylococcus, que son cocos Gram (+), agrupadas en racimos, son metabólicamente muy activas, es decir, tienen la capacidad de producir enzimas y toxinas que intervienen en los procesos patogénicos (24). Se informa que hasta un 80% de las cepas de este género producen

B-lactamasas y 60 a 70% muestran resistencia a penicilinas (2,23,26,27). Aunque forman parte de la flora normal de la piel y mucosas del hombre y de los animales, algunas son oportunistas y llegan a provocar diversas infecciones piógenas, mastitis y ocasionalmente septicemias (24). Por otra parte, las Nocardias son bacilos pleomórficos Gram (+), parcialmente ácido-resistentes, sin agrupación definida, de crecimiento lento (48-72 h) son patógenos oportunistas. Nocardiasis es un problema clínico serio especialmente en pacientes que han sido tratados con corticosteroides o con algún otro agente inmunosupresor (4,21,40). N. asteroides es un importante productor de mastitis bovina, generalmente introducida por el hombre. Clínicamente se manifiesta como abscesos localizados, celulitis ó linfangitis supurativa ascendente, la infección ocurre por inoculación local y la diseminación es rara (38,39), las infecciones en perros y en animales de granja son comunes (24). Por ser un organismo de crecimiento lento, Nocardia puede eludir las pruebas rutinarias de diagnóstico por estudios de cultivo (1,36) por lo que existe poca información sobre su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos; en la literatura se menciona que las sulfonamidas son el tratamiento de elección, pero ya hay informes acerca de la resistencia a estas (21,39,40). Estudios recientes han mostrado que las Nocardias producen B-lactamasas, las cuales juegan un papel importante en su resistencia a agentes quimioterapéuticos (39). Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos o cocobacilos Gram (-), son habitantes del tracto gastrointestinal de animales y del hombre, son excretados por heces, E. coli puede actuar como un patógeno oportunista de procesos miscelaneos tales como mastitis, onfaloflevitis, infecciones de las vías urinarias y respiratorias. Existe información sobre resistencia mediada por B-lactamasas (10).

El ácido clavulánico se aisló de Streptomyces clavuligerus (American Type Culture Collection 27064) (32), es un inhibidor de B-lactamasas. Este compuesto es parecido en su núcleo a las penicilinas por lo que evita su hidrólisis, ya que bloquea el sitio activo de la enzima B-lactamasa, evitando así su unión con el anillo B-lactámico de las penicilinas. La actividad del ácido clavulánico no es como antimicrobiano, únicamente inhibe las B-lactamasas (9,30). Se ha reportado sinergismo entre antibióticos B-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) y el ácido clavulánico. Las B-lactamasas reducen el espectro de acción de las penicilinas como la amoxicilina, lo que se puede resolver con el uso del ácido clavulánico (3,8,10,12,14,16,17,19,20,35,39,41). La amoxicilina es una penicilina semisintética con un espectro de acción sobre

bacterias Gram(+) y como puede difundir a través de la membrana externa de las bacterias Gram(-), se le considera de amplio espectro, tiene buena absorción y rápida actividad bactericida (10,38). El mecanismo de acción de la amoxicilina impide la transpeptidación de la pared celular bacteriana, evitado así la unión polimérica de los llamados nucleótidos de Park (unidades funcionales y estructurales de la pared) (38). Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias generan resistencia a los agentes B-lactámicos, en este caso al utilizar amoxicilina combinada con ácido clavulánico este último va a inhibir a la enzima B-lactamasa producida por las cepas resistentes, por lo que la amoxicilina podrá ejercer su efecto sobre la síntesis de la pared celular, causando la lisis bacteriana. Hay varios reportes que describen el uso combinado del ácido clavulánico y de la amoxicilina contra infecciones bacterianas (resistentes a penicilinas), con resultados positivos (3,8,10,12,14,16,17,19, 20,31,32,35,39,41).

Para la realización de pruebas de susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos, existe el método de Kirby-Bauer que fue estandarizado y aprobado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de los Estados Unidos de América (29). Su importancia se debe a su reproducibilidad y comparatividad epidemiológica, este método fue utilizado con el propósito de evaluar el efecto de la combinación ácido clavulánico-amoxicilina contra cepas de Staphylococcus, Nocardia y E. coli resistentes a penicilina, dentro de las cuales se detectaron las productoras de la enzima B-lactamasa con el objeto de demostrar que al utilizar el ácido clavulánico se inhibe la acción de esta enzima, permitiendo así que la amoxicilina realice su efecto bactericida. Para determinar este efecto se utilizaron dos concentraciones tanto de la combinación ácido clavulánico-amoxicilina como de amoxicilina sola.

MATERIALES Y METODOS

1) Se utilizaron 40 cepas de Staphylococcus, 15 cepas de Nocardia y 5 cepas de E. coli, aisladas de casos clínicos de diversas especies que mostraron resistencia a penicilinas por pruebas de susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos por difusión en agar. Estas bacterias se obtuvieron del cepario del Departamento de Bacteriología y Micología de la FMVZ- UNAM.

2) Se usaron sensidiscos* con diferentes concentraciones, dos con amoxicilina y ácido clavulánico: a) amoxicilina 20 µg + ácido clavulánico 10 µg, b) amoxicilina 2 µg + ácido clavulánico 1 µg y dos únicamente con amoxicilina: c) 25 µg y d) 2 µg.

3) Se efectuó el método Kirby-Bauer de susceptibilidad a antimicrobianos por difusión en agar con disco (7), que consiste en colocar un disco de papel impregnado con agentes quimioterapéuticos en una caja de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo problema a concentración conocida, la droga presenta un gradiente de difusión circular en el agar alrededor del disco, las zonas de inhibición de crecimiento bacteriano se aprecian alrededor del disco después de 24 horas de incubación. El tamaño de las zonas de inhibición depende de la difusibilidad del antimicrobiano en el agar y de la susceptibilidad de la bacteria al agente quimioterapéutico (5,7,18,33). Estos diámetros de inhibición pueden ser medidos con una regla por la parte de abajo de la caja o por sistemas de iluminación como lo menciona Barry (6).

3.1) En el método Kirby-Bauer la preparación del inóculo se realiza de la siguiente manera: después de sembrar las bacterias en agar tripticasa soya se incuba durante 16 horas, posteriormente se toman 3 a 10 colonias y se introducen en un tubo que contenga 4 ml de caldo triptosa fosfato ó tripticasa soya. Los tubos se incuban durante 2 a 5 horas para producir una suspensión bacteriana de moderada turbidez, una vez obtenido el inóculo, la suspensión se estandariza a una densidad igual al tubo No 0.5 del Nefelómetro de McFarland (5×10^7 Unidades formadoras de colonias (UFC) por ml) (estándar de turbidez) (7,29). En este proyecto se utilizó la modificación hecha por D'amato (13) para la preparación rápida del inóculo, para las cepas de Staphylococcus y de E. coli, esta consiste en suspender

* Marca Oxoid, proporcionados por Smith Kline y Beecham de México S.A. de C.V.

una cantidad suficiente de colonias en 4 ml de agua destilada estéril e igualar la densidad del tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland.

3.2) Para la preparación del inóculo con cepas de Nocardia se utilizaron dos técnicas del método de Wallace (40) ya que estas bacterias tienden a aglomerarse durante el crecimiento (4). Una fue colocando los microorganismos en matraces de Erlen-Meyer de 125 ml con caldo tripticosa soya y perlas de cristal, en baño maría a 37 C en agitación constante durante 96 horas y la otra se realizó en tubos de 20 ml con caldo tripticosa soya que contenían esferas de cristal, los tubos fueron incubados a 37 C y mezclados por 15 a 30 seg diariamente en un mezclador vortex durante 48 a 96 horas con el objeto de obtener una suspensión adecuada que se ajustó al estándar de turbidez del tubo No. 1 del Nefelómetro de McFarland (3×10^8 UFC por ml) (36,40).

4) Se utilizaron cajas de Petri de 100 mm con placas de agar Mueller-Hinton (5 a 6 mm) con menos de 4 días de preparación. Las cajas se dejaron secar antes de ser inoculada la suspensión bacteriana, se sembraron con un hisopo estéril en tres planos en el agar, se dejaron secar de 3 a 5 min, los sensibilizadores se colocaron en el agar con pinzas flameadas asegurando el contacto con el medio. Las cajas se incubaron de inmediato a 37 C durante 24 h. para Staphylococcus y para E. coli y 48 a 72 h. para Nocardia, después de la incubación se midió el diámetro de la zona de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco) con una regla por la parte inferior de la caja.

5) Con todas las cepas de los tres géneros se realizaron tres repeticiones.

6) Se realizó la prueba rápida acidométrica de detección de la enzima B-lactamasa (25) en la cual se adicionan 2 ml de solución de rojo fenol al 0.5 % a 16.6 ml de agua destilada estéril y se inyecta en una ampula que contenga 20 millones de UI de Penicilina G. A la mezcla se le agregó NaOH al 1 M en gotas hasta alcanzar un pH 8.5 medido en potenciómetro. Se preparó el inóculo con una turbidez igual al estándar No. 4 del Nefelómetro de McFarland (12×10^8 UFC por ml) de un cultivo de 24 h. Se colocaron 0.1 ml del sustrato anterior en una microplaca, se mezcló 0.1 ml del inóculo, si había producción de B-lactamasas la solución cambiaba a color amarillo en los primeros 15 minutos.

7) ANALISIS ESTADISTICO

Para evaluar los resultados del trabajo se realizó un

análisis de varianza con el modelo mixto siguiente (28)
 (modelo 1):

$$Y_{ijklmn} = \mu + T_i + G_j + S_k(j) + V_l(jk) + I_m + (TG)_{ij} + (TI)_{im} + \epsilon_{(ijklm)n}$$
 donde:

Y_{ijklmn} es la n-esima respuesta medida en mm de halo de inhibición del m-esimo nivel de presencia de B-lactamasa en la especie l-esima dentro de la variedad k-esima y del género j-esimo, con el quimioterapéutico i-esimo.
 μ es la media poblacional.
 T_i es el efecto del i-esimo quimioterapéutico (i=1,.....4)
 G_j es el efecto del género j-esimo (j= Staphylococcus, Nocardia y Escherichia).
 $S_k(j)$ es el efecto de la k-esima especie dentro del j-esimo género (k=1,.....c).
 $V_l(jk)$ es el efecto de la l-esima variedad dentro de especie y género.
 I_m es el efecto de la presencia de B-lactamasa (m=1,0).
 $(TG)_{ij}$ es el efecto de la interacción del quimioterapéutico y el género de la bacteria.
 $(TI)_{im}$ es el efecto de la interacción del quimioterapéutico y la presencia de B-lactamasa.
 $\epsilon_{(ijklm)n}$ es el error aleatorio presente en el experimento. NID $(0, \sqrt{\epsilon})$.

El efecto del quimioterapéutico y de la presencia de B-lactamasa fué evaluado para cada uno de los géneros mediante el modelo siguiente (modelo 2):

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + Q_j + (BQ)_{ij} + ijk$$
 donde:
 Y_{ijk} es la k-esima respuesta medida en mm de halos de inhibición.
 μ es la media poblacional.
 B_i es el efecto de la presencia de B-lactamasa (1,0) (1 = presencia y 0 = ausencia).
 Q_j es el efecto del j-esimo agente.
 $(BQ)_{ij}$ es el efecto de la interacción.
 (ijk) es el error aleatorio presente en el experimento ϵ NID $(0, \sqrt{\epsilon})$.

Los modelos fueron analizados por el método de cuadrados mínimos, mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) (34). Los rangos de inhibición en el modelo 2 se obtuvieron mediante el método de Duncan de separación de medias con el mismo paquete. El nivel de significancia utilizado para estas pruebas fue de 0.01 ($\alpha=0.01$).

RESULTADOS

a) En el método de Kirby-Bauer se obtuvieron los halos de inhibición para cada cepa y concentración, con los cuales se calcularon los rangos y medias para Staphylococcus (cuadro 8), para Nocardia (cuadro 9) y E. coli (cuadro 10).

b) Con el método utilizado para la detección de la enzima B-lactamasa 28 cepas de Staphylococcus resultaron positivas a la producción de esta enzima (70 %) y 12 negativas (30 %). De las cepas de Nocardia 11 fueron productoras de la enzima (73 %) y 4 fueron negativas (27 %) y de las 5 cepas de E. coli 1 fue positiva (20 %) y 4 fueron negativas a la producción de B-lactamasa (80 %) (cuadro 6). Para los tres géneros el 66.6 % de todas las cepas fueron productoras de B-lactamasa y 33.3 % fueron negativas (cuadro 5)

c) En general la combinación ácido clavulánico-amoxicilina 10 µg y 20 µg respectivamente (Conc. A), mostró halos de inhibición más amplios comparados con las otras concentraciones, la que le siguió fue amoxicilina sola (Conc. B). La combinación de ácido clavulánico-amoxicilina 1 µg y 2 µg respectivamente (Conc. C), manifestó una efectividad muy cercana a la del agente anterior y la menor la presentó amoxicilina sola a 2 µg (Conc. D) (cuadro 3).

d) El género bacteriano que resultó más susceptible en este trabajo tanto a las combinaciones como a los quimioterapéuticos solos fue Staphylococcus seguido por E. coli y por último Nocardia (cuadro 4).

e) La respuesta del género de acuerdo con cada concentración fue la siguiente: la mayor susceptibilidad para todas las concentraciones (A, B, C y D) se presentó en el género Staphylococcus. Para Nocardia y E. coli la respuesta varió, con las concentraciones A y D tuvo mayor susceptibilidad Nocardia y con B y C E. coli, aunque en las concentraciones C y D la respuesta de estos dos géneros fue parecida (figura 1).

f) En promedio los mayores halos de inhibición en todas las concentraciones se obtuvieron de las cepas no productoras de B-lactamasa, aunque en las concentraciones C y D son muy parecidos (cuadro 5 y figura 2).

g) Se encontró que todos los efectos en los tres géneros estudiados son significativos ($P < 0.01$), con excepción de la presencia de B-lactamasa que no fue significativa ($P > 0.01$) (cuadro 1). En cuanto a cada género esto varió, para Staphylococcus los efectos de B-lactamasa

y la interacción B-lactamasa-agente quimioterapéutico no fueron significativos pero el agente quimioterapéutico solo si lo fue. Mientras que para Nocardia y E. coli los tres efectos si fueron significativos (cuadro 2), lo cual indica los efectos que influyen en el comportamiento de este estudio.

h) Los rangos de sensibilidad a los quimioterapéuticos para cada género se dividieron en susceptibles, intermedios y resistentes al agente quimioterapéutico de acuerdo con el nivel de significancia de los grupos formados en la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (cuadro 7).

DISCUSION

El método de Kirby-Bauer de susceptibilidad a quimioterapéuticos fue efectivo en este estudio así como las modificaciones de D'amato y Wallace, que ahorraron tiempo y facilitaron el trabajo de laboratorio, ya que se siguieron los pasos establecidos por sus autores, resultando como está indicado (2,7,13,40). Con estos métodos se obtuvieron los halos de inhibición en mm para los tres géneros, con las diferentes concentraciones de los agentes quimioterapéuticos.

Se utilizó la prueba rápida acidométrica (25) para la detección de la enzima B-lactamasa en todas las cepas de los tres géneros, que dió buen resultado. El género que presentó un mayor número de cepas positivas a la enzima fue Nocardia (73 %), con estos resultados se puede inferir la importancia de esta enzima en la resistencia a penicilinas por parte de Nocardia. Para el género Staphylococcus, la cantidad de enzima detectada fue del 70 % lo cual concuerda con la literatura que menciona hasta un 80 % (26). Para E. coli solo se detectó 20 %, siendo que este género es de los mayores productores de B-lactamasa (10), esto puede deberse a la pequeña cantidad de cepas trabajadas.

En el análisis para todas las cepas la combinación efectiva en cuanto al tamaño de halos de inhibición fue ácido clavulánico con amoxicilina a 10 µg y 20 µg, respectivamente, la respuesta de las otras concentraciones no fue muy favorable ya sea por la baja cantidad de amoxicilina y/o de ácido clavulánico, le siguieron amoxicilina sola con 25 µg y la combinación de ácido clavulánico-amoxicilina con 1 µg y 2 µg respectivamente, que mostraron una efectividad muy cercana entre sí, con esto se nota que al combinar con el ácido clavulánico es posible aumentar la efectividad y disminuir la concentración del quimioterapéutico, ya que la combinación con 2 µg de amoxicilina actúa casi igual que la amoxicilina sola a 25 µg, lo que permite deducir que con el ácido clavulánico se aumenta mas de 10 veces la acción de la amoxicilina. La concentración menos efectiva fue la amoxicilina sola a 2 µg.

En la respuesta de cada género, Staphylococcus presentó halos de inhibición de mayor tamaño en todas las concentraciones, en cuanto a Nocardia y E. coli fue variada, ambos géneros respondieron positivamente solo con la concentración A, en la que resultó mas favorable Nocardia, con las concentraciones B, C y D no fue muy favorable ya que aparentemente las concentraciones no son suficientes para obtener un buen resultado. Las medias de los halos de inhibición son bajas en el cuadro 4, ya que se tomaron en cuenta los promedios de las cuatro concentraciones y el

tamaño de los halos de las concentraciones bajas fueron muy pequeños y por la misma razón las desviaciones estándar son altas, ya que al tomarse en cuenta las cuatro concentraciones los rangos de los halos de inhibición se amplían mucho.

Los resultados indican que hay una mayor efectividad sobre las cepas no productoras de B-lactamasa, ya que estas cepas no tienen ningún impedimento para que el agente quimioterapéutico pueda ejercer su efecto bactericida al no haber producción de B-lactamasa, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Appelbaum *et al.* (3) en su estudio donde encuentra que hay mayor porcentaje de susceptibilidad en las cepas no productoras de B-lactamasa. En este trabajo en promedio el tamaño del halo de inhibición en las no productoras de B-lactamasa fue de 19.9 mm y en las productoras de B-lactamasa fue de 18.5 mm. De acuerdo con cada concentración: la A de ácido clavulánico (10 µg) y amoxicilina (20 µg), tiene una efectividad ligeramente mayor sobre las cepas no productoras de B-lactamasa. Con la concentración B amoxicilina (25 µg) se encontró una mayor respuesta en las no productoras de B-lactamasa. Con la C de ácido clavulánico (1 µg) y amoxicilina (2 µg) la mayor respuesta fue de las productoras de B-lactamasa y con la concentración D amoxicilina sola (2 µg) se notó una mayor respuesta en las no productoras de B-lactamasa.

Es muy importante la significancia de los efectos analizados ya que de esto depende su influencia en el comportamiento del estudio, puesto que en general todos ellos fueron significativos ($P < 0.01$), menos la presencia de B-lactamasa que resultó no significativa ($P > 0.01$). En cuanto a cada género hubo variación, ya que para Staphylococcus los efectos B-lactamasa y la interacción B-lactamasa y agente quimioterapéutico no fueron significativos, aunque el agente quimioterapéutico solo sí lo fue. Para Nocardia y E. coli estos tres efectos fueron significativos. Por lo tanto en el caso de Staphylococcus no se puede considerar la inhibición de la B-lactamasa por parte del ácido clavulánico, aunque la literatura se mencione que la resistencia a penicilinas a través de esta enzima en Staphylococcus es de gran importancia (23,26). mientras que en Nocardia y E. coli se tomó en cuenta la inhibición de esta enzima ya que el efecto B-lactamasa fue significativo. Staphylococcus fue el género que con más facilidad se pudo trabajar ya que no presentó dificultades en su cultivo, en la preparación del inóculo ni en el antibiograma. Por ser un género que con gran frecuencia se encuentra como agente etiológico en procesos patógenos y presenta una elevada producción de B-lactamasa se trabajaron mayor cantidad de cepas. Aunque no se pueda asegurar que haya habido inhibición de B-lactamasas por parte del ácido

clavulánico, existió una mayor efectividad de las diferentes concentraciones sobre este género, siendo el más susceptible a la combinación ácido clavulánico-amoxicilina. El mecanismo de acción sobre este género no es claro aún. Los resultados coinciden con los de Boom y Beale (8) quienes utilizaron esta combinación (amoxicilina-ácido clavulánico) contra Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes obteniendo buenos resultados, también Fleisher et al. (16) logró resultados positivos con la misma combinación contra Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes y Haemophilus.

E. coli. Se decidió utilizar este género porque comúnmente se encuentra en procesos patógenos de animales y del hombre y además son de los mayores productores de B-lactamasas (10). Como la cantidad de cepas trabajadas fue escasa, hubo un bajo porcentaje de productoras de B-lactamasas por ello tampoco es posible asegurar que haya existido inhibición de esta enzima por parte del ácido clavulánico aunque sí se puede afirmar que la respuesta fue favorable a la combinación ácido clavulánico-amoxicilina. Existe un trabajo de Bywater et al. (10) en el que se prueba la combinación de ácido clavulánico- amoxicilina contra E. coli en perros, mostrando una buena efectividad lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Nocardia. Es un género bacteriano sobre el que existe poca información en cuanto a su susceptibilidad, provoca daños en explotaciones lecheras y se encuentran dentro de las bacterias productoras de B-lactamasa (39), por lo que fue interesante emplearla en este estudio. Esta bacteria presentó dificultades en su cultivo ya que hubo contaminación y fue necesario realizar varios pases para purificarla, para la preparación del inóculo se utilizaron 2 técnicas, una se hizo con matraces Erlen-Meyer e incubación en baño maría, y como se contaminó el cultivo se optó por emplear el método de tubos de ensaye en incubadora en el que no existió contaminación, lográndose el inóculo esperado como lo describió Wallace en su estudio (40). Con esta bacteria sí resultó significativa la presencia de B-lactamasa por lo que se puede asegurar que hubo inhibición de esta enzima, ya que se obtuvieron halos de inhibición indicadores de susceptibilidad. Los resultados de este trabajo coinciden con los de Wallace et al. (39) quien reporta buena eficiencia de la combinación (ácido clavulánico-amoxicilina) contra Nocardia brasiliensis, aunque Steingrube et al. (37) encuentra resistencia por parte de cepas de Nocardia brasiliensis pero la explican como consecuencia de una mutación que afecta el sitio activo inhibidor de B- lactamasas.

El cuadro (7) de susceptibilidad a los quimioterapéuticos obtenido en mm de inhibición en cada uno

de los géneros puede ser utilizado como referencia para detectar cepas susceptibles, intermedias o resistentes a estos agentes a las mismas concentraciones.

Existen trabajos sobre la utilización de la combinación ácido clavulánico-amoxicilina en medicina veterinaria, como el de Bywater et al. (10) donde se prueba contra E. coli y Klebsiella en perros y se reporta que existe buena absorción, buena distribución al igual que buena eficacia contra estas bacterias productoras de B-lactamasa. Gilmour et al. (19) probó esta combinación contra pasterelosis en borregos y los resultados mostraron una marcada reducción en las manifestaciones clínicas, patológicas y bacteriológicas de la pasterelosis. Otro trabajo con más de 100 perros con signos respiratorios fue realizado por Simmons et al. (35) en el que se trató con la misma combinación y también mostró resultados positivos.

Después del estudio realizado y de las investigaciones hechas, se puede recomendar su uso contra Nocardias productoras de B-lactamasa. Para Staphylococcus y E. coli la combinación funciona pero no es posible asegurar que sea por inhibición de B-lactamasas, sería recomendable que en México se hicieran estudios in vitro así como su aplicación in vivo para una mejor evaluación de su eficacia.

Cuadro 1

**Análisis de varianza para la variable dependiente mm de
 inhibición (modelo 1)**

Origen de la variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F
Quimioterapéutico	3	77.33**	0.0001
Género	2	62.35**	0.0001
Especie (género)	4	3.43**	0.0001
Variedad (género* especie)	6	2.30**	0.0001
Presencia de B- lactamasa	1	0.93NS	0.0229
Quimioterapéutico* B-lactamasa	3	1.15**	0.0003
Quimioterapéutico*género	6	3.16**	0.0001
Error	694	0.18	
Total	719		

 NS No Significativo (P > 0.01)

** Significativo (P < 0.01)

Cuadro 2

Niveles de significación de los efectos B-lactamasa y Agentes quimioterapéuticos (modelo 2)

Efectos	<i>Staphylococcus</i> Pr>F	<i>Nocardia</i> Pr>F	<i>E. coli</i> Pr>F
B-lactamasa	0.1447NS	0.0001**	0.0001**
Agentes QT.	0.0001**	0.0001**	0.0001**
B-lact.+Agentes QT.	0.5353NS	0.0002**	0.0001**

NS No Significativo (P>0.01)
 ** Significativo (P<0.01)

Cuadro 3

Medias aritméticas conforme el quimioterapéutico en mm de halos de inhibición y desviaciones estándar

QT.	Media (mm)	Desv. est. (mm)		CV %
A	28.1	4.9	a	17.40
B	18.5	7.9	b	42.70
C	16.7	6.8	c	40.72
D	12.9	4.9	d	37.58

QT. A amoxicilina 20 ug + ácido clavulánico 10 ug

QT. B amoxicilina 25 ug

QT. C amoxicilina 2 ug + ácido clavulánico 1 ug

QT. D amoxicilina 2 ug

a,b,c,d literales distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$).

Cuadro 4

**Medias aritméticas en mm de inhibición de las 4
diferentes concentraciones en cada género**

Género	Medias (mm)	Desv. est. (mm).
<i>Staphylococcus</i>	21.64	6.5
<i>E. coli</i>	16.03	9.7
<i>Nocardia</i>	12.95	7.8

Cuadro 5

Medias aritméticas para presencia de B-lactamasa				
Presencia de B-lactamasa	No %	No.de casos	Halos de Inhib. media (mm)	Desviación estándar (mm)
Negativo	33.3	240	19.91	0.85 a
Positivo	66.6	480	18.66	0.84 a

a,a literales iguales denotan que no hay diferencias significativas (P>0.01).

Cuadro 6

Presencia de B-lactamasa por Géneros

Género	Positivo	Negativo
<i>Staphylococcus</i>	70 %	30 %
<i>Nocardia</i>	73 %	27 %
<i>E. coli</i>	20 %	80 %

Cuadro 7

Rangos de sensibilidad a los quimioterapéuticos.

Género	QT.	Rangos(mm)		
		Suscept.	Interm.	Resist.
<i>Staphylococcus</i>	A	>30.0	23.0-30.0	<23.0
	B	>24.6	20.0-24.6	<20.0
	C	>28.6	20.6-28.6	<20.6
	D	>26.6	17.3-26.6	<17.3
<i>Nocardia</i>	A	>36.3	21.6-36.3	<21.6
	B	>34.6	21.3-34.6	<21.3
	C	>16.0	13.0-16.0	<13.0
	D	>14.0	13.0-14.0	<13.0
<i>E. coli</i>	A	>26.6	23.0-26.6	<23.0
	B	>26.3	22.6-26.3	<22.6
	C	>15.6	10.0-15.6	<10.0
	D	>13.3	10.0-13.3	<10.0

 QT. A amoxicilina 20 ug + ácido clavulánico 10 ug

QT. B amoxicilina 25 ug

QT. C amoxicilina 02 ug + ácido clavulánico 01 ug

QT. D amoxicilina 02 ug

Cuadro 8

Staphylococcus rangos y medias de halos de inhibición

Quimioterapéuticos	Rangos (mm)	Medias (mm)
A	15.3-36.6	31.7
B	11.6-36.0	23.8
C	10.3-28.6	22.6
D	7.0-26.6	16.9

QT. A amoxicilina 20 ug + ácido clavulánico 10 ug

QT. B amoxicilina 25 ug

QT. C amoxicilina 2 ug + ácido clavulánico 1 ug

QT. D amoxicilina 2 ug

Cuadro 9

Nocardia rangos y medias de halos de inhibición

Quimioterapéuticos	Rangos (mm)	Medias (mm)
A	21.0-37.3	26.6
B	6.0-35.3	12.9
C	6.0-14.0	8.8
D	6.0-14.0	8.5

QT. A amoxicilina 20 ug + ácido clavulánico 10 ug

QT. B amoxicilina 25 ug

QT. C amoxicilina 2 ug + ácido clavulánico 1 ug

QT. D amoxicilina 2 ug

Cuadro 10

E. coli rangos y medias de halos de inhibición

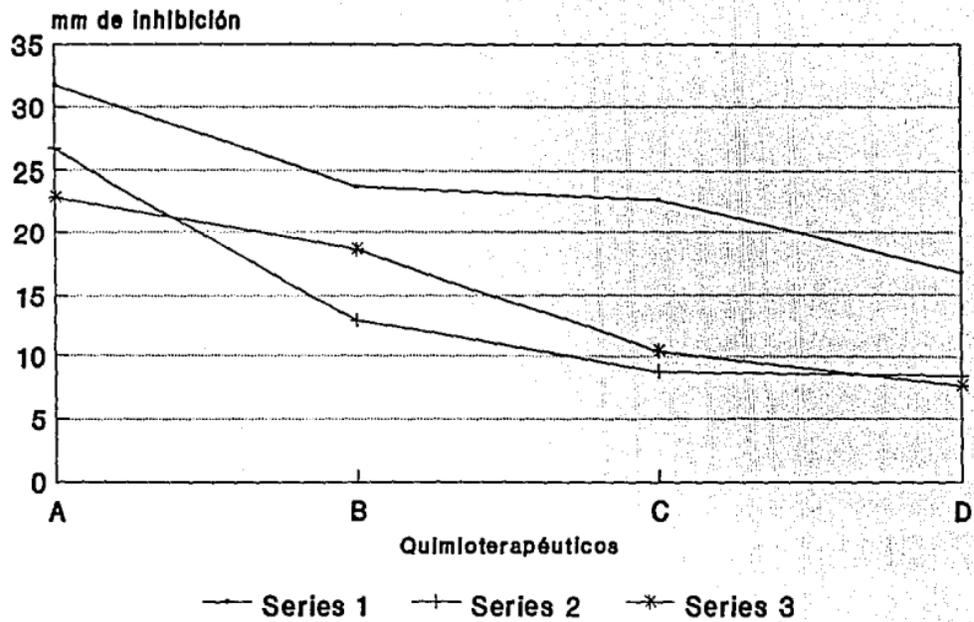
Quimioterapéuticos	Rangos (mm)	Medias (mm)
A	21.6-26.6	22.9
B	6.0-26.3	18.6
C	8.0-15.6	10.4
D	6.0-13.3	7.7

QT. A amoxicilina 20 ug + ácido clavulánico 10 ug

QT. B amoxicilina 25 ug

QT. C amoxicilina 2 ug + ácido clavulánico 1 ug

QT. D amoxicilina 2 ug



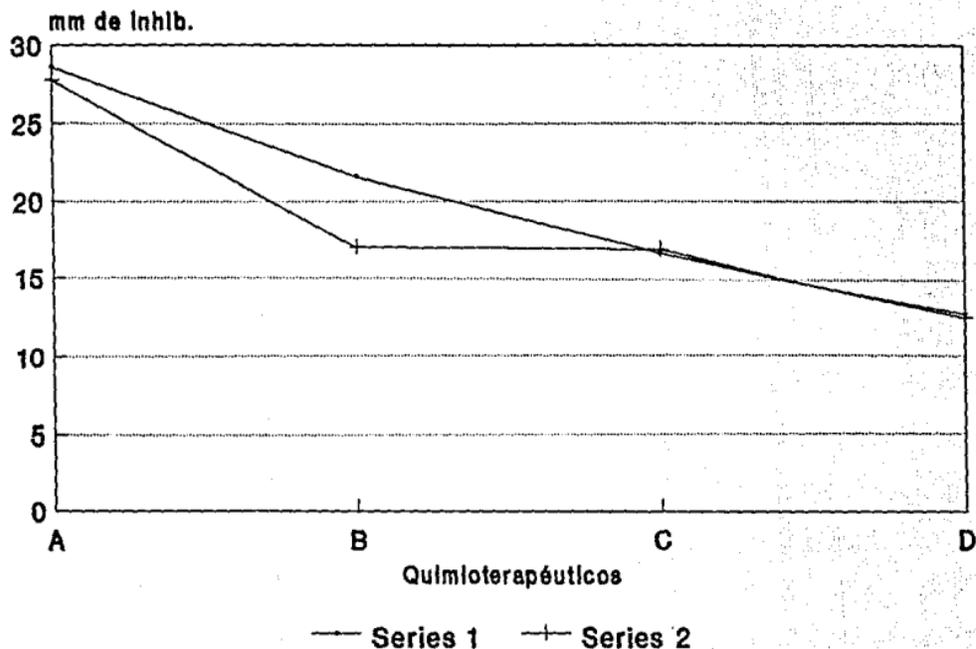
Serie 1 *Staphylococcus*.

Serie 2 *Nocardia*

Serie 3 *E. coli*

Figura 1

Interacción quimioterapéutico sobre género



Serie 1 negativo a B-lactamasa

Serie 2 positivo a B-lactamasa

Figura 2

Interacción Quimioterapéuticos sobre presencia de B-lactamasa.

LITERATURA CITADA

1. Al-Bassam, L.S., Kastandi, J.D. y Kamalapur, P.N.: Nocardia asteroides as a causative agent of mastitis in dairy cattle in Iraq. Indian Vet. J. **66** 10-12 (1989)
2. Alfonseca, S.E., García, D.G.A., Tapia, P.G. y Avila, T.S.: Aplicación de la técnica estandarizada de Kirby-Bauer para determinación de susceptibilidad a quimioterapéuticos con S. aureus aislados de mastitis bovina. Tesis de licenciatura. FMVZ-UNAM México D.F. 1991.
3. Appelbaum, P.C., Spangler, S.K. and Jacobs, R.M.: B-lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole of 320 non-Bacteroides fragilis, Bacteroides isolates and 129 Fusobacteria from 28 U.S. centers. Antimicrob. agents Chemother. **34** (8) 1546-1550 (1990).
4. Bach, C.M., Sabath, L.D. and Finland, M.: Susceptibility of Nocardia asteroides to 45 antimicrobial agents in vitro. Antimicrob. agents Chemother. **3** (1) 1-8 (1973).
5. Baker, C.N., Thornsberry, C. and Hawkinson, W.R.: Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing; evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. J. Clin. Microbiol. **17** (3) 450-457 (1983).
6. Barry, A.L., Coyle, M.B. and Thornsberry, C.: Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. J. Clin. Microbiol. **10** (6) 885-889 (1979).
7. Bauer, A.W., Kirby, M.M. Sherris, J.C., and Turk, M.: Antibiotic susceptibility test by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. **45** (4) 493-496 (1966).
8. Boon, R.J., and Beale, A.S.: Response of Streptococcus pyogenes to therapy with amoxicillin or amoxicillin-clavulanic acid in a mouse model of mixed infection caused by Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes. Antimicrob. agents Chemother. **31** (8) 1204-1209 (1987).
9. Brooks, G., Coleman, K., Davies, J.S., and Hunter, P.A.: Synthesis and B-lactamase inhibitory activity of 9-(2-amido ethenylthio)-9-deoxy derivatives of clavulanic acid.

J. Antibiot. 41 (7) 892-897 (1988).

10. Bywater, R.J., Palmer, G.H., Buswell, J.F. and Stanton, A.: clavulanate-potentiocated amoxicillin activity in vitro and bioavallability in the dog. Vet. Rec. 116 (2) 33- 36 (1985).

11. Cottral, G.E.: Manual of standarizad methods for veterinary microbiology. Comstock Publishing Associates, Cornell Univ., London (1978).

12. Cynamon, M.H. and Palmer, G.S.: In vitro activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid against Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. agents Chemother. 24 (3) 429-431 (1983).

13. D'amato, R.F. and Hochstein, L.: Evaluation of a rapid inoculum preparation method for agar disk diffusion susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 15 (2) 282-285 (1982).

14. Decazes, J.M., Bure, A., Wolff M., Kitzis, M.D., Pangon , B. and Modai, J.: Bactericidal activity against Haemophilus influenzae of cerebrospinal fluid of patients given amoxicillin-clavulanic acid. Antimicrob. agents Chemother. 31 (12) 2018-2019 (1987).

15. Falkow, S.: Infections multiple drug resistance. Pion limited. Londres. (1975).

16. Fleisher, G.R., Wilmott, C.M. and Campos, J.M.: Amoxicillin combined with clavulanic acid for the treatment of soft tissue infections in children. Antimicrob. agents Chemother. 23 (5) 679-681 (1983).

17. Fuchs, P.C., Barry, A.L., Thornsberry, C. and Jones, R.N.: In vitro activity of ticarcilina plus clavulanic acid against 632 clinical isolates. Antimicrob. agents Chemother. 25 (3) 392-394 (1984).

18. Fuchs, P.C., Jones, R.N. and Barry, A.L.: Interpretative criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupuracin, a topical antibiotic. J. Clin. Microbiol. 28 (3) 609 (1990).

19. Gilmour, N.J.L., Gilmour, J.S., Quirie, M. and Donachie, W.: Treatment of experimental pasteurellosis in lamb with clavulanic acid and amoxicillin. Vet. Rec. 126: 311 (1990).

20. Goldstein, E.J.C. and Citron, D.M.: Comparative in vitro activities of amoxicillin-clavulanic acid and imipenem against anaerobic bacteria isolated from community hospitals. Antimicrob. agents Chemother. 22 (1) 158-160 (1986).
21. Gutmann, L., Goldstein, F.W., Kitzis, M.D. and Hauterfort, B.: Susceptibility of Nocardia asteroides to 46 antibiotic including 22 B-lactams. Antimicrob. agents Chemother. 23 (2) 248-251 (1983).
22. Hernández, A.L.: Sensibilidad antimicrobiana y producción de B-lactamasa en S. aureus y Staphylococcus coagulasa (-) aislados de mastitis bovina. Vet. Mex. 22 (3) 290-294 (1991).
23. Horovitz, C.T. and Ziv, G.: Susceptibility of S. aureus of bovine udder origin to antimicrobial drugs and heavy metals. Isr. J. Vet. Med. 44 (2) 119-123 (1988).
24. Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A.: Microbiología médica. 11a Edición Ed. El Manual Moderno México D.F. 1985.
25. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J.Jr. and Shadomy, H.J.: Manual of clinical microbiology 4th. ASM, Washington. 1985.
26. Lyon, B.R. and Skurray, R.: Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic bases. Microbiol. Rev. 52 (1) 88-134 (1987).
27. McDougal, L.K. and Thornsberry, C.: New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility test for methicillin resistant (heteroresistant) Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 19: 482-488 (1984).
28. Mendez, I.: Experimentos factoriales balanceados completos IIMAS-UNAM. 3 1-75 (1976)
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards: "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test." M2-A3. 3th. NCCLS. 4 (16) (1984).
30. Neu, A.C. and Fu, R.P.; Clavulanic acid a novel inhibitor of B-lactamases. Antimicrob. agents Chemother. 14 (5) 650-655 (1978).
31. Nicolai, D.J., Lammel, C.J. Bayford, B.A. and

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Morris, J.H.: Effects of storage temperature and pH on the stability of eleven B-lactam antibiotics in MIC trays. J. Clin. Microbiol. 21 (3) 366-370 (1985).
32. Reading, C. and Cole, M.: Clavulanic acid; a B-lactamase inhibiting B-lactam from Streptomyces clavuligerus. Antimicrob. agents Chemother. 11 (5) 852-857 (1977).
33. Rian, K.J., Schoeknecit, F. and Kirby, M.M.; Disk sensitivity testing. Hospital Practice 91-100 (1970).
34. SAS Institute Inc. SAS/GRAPH User's Guide, release 6.03 edition Cary, NC, SAS Institute Inc., 1988 549 pp.
35. Simmons, D.R., Keefe, T.J. and Kilgore, W.R.; Treating respiratory infections with amoxicillin-clavulanic acid. Vet. Med. 81 (10) 982-984 (1986).
36. Singh, M., Sandhu, R.S. and Randhawa, H.S.: Comparison of paraffin baiting and conventional culture techniques for a isolation of Nocardia asteroides from sputum. J. Clin. Microbiol. 25 (1) 176-177 (1987).
37. Steingrube, V.A., Wallace, R.J., Brown, B.A., Pang, Y., Zeluff, B. and Steel, L.C.: Acquired resistance of Nocardia brasiliensis to clavulanic acid related to a change in B-lactamase following therapy with amoxicillin-clavulanic acid. Antimicrob. agents Chemother. 35 (3) 524-528 (1991).
38. Sumano, L.H. y Ocampo, C.L.: Farmacología veterinaria. Mc Graw Hill, México D.F. 1989.
39. Wallace, R.J., Nagh, D.R., Johnson, W.K., Steel, L.C. and Steingrube, V.A.: B-lactam resistance in Nocardia brasiliensis is mediated by B-lactamase and reversed by the presence of clavulanic acid. J. inf. Dis. 156 (6) 959-965 (1987).
40. Wallace, R.J., Septimus, E.J., Musher, D.M. and Martin, R.R.; Disk diffusion susceptibility testing of Nocardia Species. J. Inf. dis. 135 (4) 568-576 (1977).
41. Wallace, R.J., Steele, L.C., Brooks, D.L., Luman, J.I. and McLarty, J.W.: Amoxicillin-clavulanic acid in the treatment of lower respiratory tract infections caused by B-lactamase-positive Haemophilus influenzae and Brahmanella catarrhalis. Antimicrob. agents Chemother. 27 (6) 912-915 (1985).