

45  
2g.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

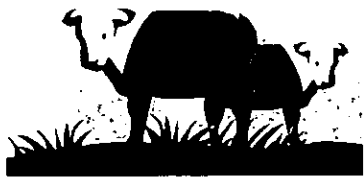
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

PATRÓN DE SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Brucella melitensis* AISLADAS DE  
HUMANOS Y ANIMALES DENTRO DE LA REPÚBLICA MEXICANA HACIA LOS  
ANTIMICROBIANOS INDICADOS EN LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-022-  
SSA2-1994

## T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A N :

MARÍA ASUNCIÓN MORENO PÉREZ  
ANDRÉS ROMERO GONZÁLEZ



México, D.F. 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

265404 -



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**El trabajo experimental se realizó en el  
Laboratorio de Brucelosis del Instituto  
Nacional de Diagnóstico y referencia  
Epidemiológicos.**

**Bajo la asesoría de:  
Q.B.P. Irma Hernández Monroy**

# **AGRADECIMIENTOS**

**AL JURADO:**

**PRESIDENTE: Q.F.B. MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN.**

**VOCAL: Q.B.P. IRMA HERNÁNDEZ MONROY.**

**SECRETARIO: Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.**

**SUPLENTE: Q.F.B. OSCAR GONZÁLEZ MORENO.**

**SUPLENTE: Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN.**

**POR SU VALIOSA COLABORACIÓN Y OBSERVACIONES TAN  
ACERTADAS EN LA REVISIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.**

# **DEDICATORIA**

**A NUESTROS PADRES:**

**POR EL APOYO Y CONFIANZA QUE HAN DEPOSITADO EN NOSOTROS  
A LO LARGO DE NUESTRA EXISTENCIA YA QUE SOMOS EL  
RESULTADO DE SU TRABAJO Y DEDICACIÓN.**

**A LOS INTEGRANTES DE NUESTRAS FAMILIAS Y AMIGOS.**

**POR SU APOYO Y CRÍTICAS YA QUE HAN CONTRIBUIDO A NUESTRA FORMACIÓN COMO SERES HUMANOS.**

**AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE BRUCELOSIS DEL INDRE Y ESPECIALMENTE A :**

**Q.B.P. IRMA HERNÁNDEZ MONROY.**

**Q.B.P. LIZ GRISEL BELTRÁN PARRA.**

**POR SU APOYO, OBSERVACIONES Y GRATOS MOMENTOS QUE PREVALECIERON EN EL TRANSCURSO DE NUESTRAS ACTIVIDADES.**

# CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.....	01
II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.....	02
2.1 Brucelosis.....	02
2.2 Agente etiológico.....	02
2.3 Factores de patogenicidad.....	04
2.4 Patogenia.....	04
2.5 Cuadro clínico.....	05
2.6 Tratamiento.....	05
2.7 Epidemiología.....	06
2.8 Antimicrobianos.....	07
2.9 Resistencia a los antimicrobianos.....	17
2.10 Métodos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	21
2.11 Estudios de susceptibilidad antimicrobiana del género <i>Brucella</i> a través del tiempo.....	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
IV. OBJETIVOS.....	29
V. HIPÓTESIS.....	30
VI. DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN.....	31
VII. MATERIAL.....	32
DIAGRAMA DE FLUJO.....	34
VIII. MÉTODOS.....	35
IX. RESULTADOS.....	42
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
XI. CONCLUSIONES.....	49
XII. RECOMENDACIONES.....	50
XIII. BIBLIOGRAFIA.....	51

# I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una de las zoonosis más ampliamente distribuidas a nivel mundial y es causa de grandes pérdidas para el sector salud y el sector pecuario, es uno de los problemas de salud humana y animal más graves que enfrentan algunos países del mundo.

A la brucelosis se le conoce también como fiebre de malta, fiebre ondulante, fiebre del mediterráneo, etc., el hallazgo de su agente etiológico ocurrió en 1887.

Esta enfermedad afecta a la mayoría de los animales domésticos y a algunos de los animales silvestres. Las especies de *Brucella* que afectan al humano son *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y esporádicamente *Brucella canis*. Las vías de transmisión en el humano son por contacto directo con secreciones y excreciones de animales infectados e ingestión de productos lácteos no pasteurizados que contengan al microorganismo; en el laboratorio se transmite mediante la inhalación de aerosoles y/o contacto con mucosas (conjuntiva).

La característica principal de estos microorganismos es su capacidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear lo cual explica parte de la patogenia y el porqué de la importancia de un adecuado tratamiento.

Desde 1939 se han llevado a cabo estudios de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Brucella* (31-36), entre estos estudios existen diferencias metodológicas y en la actualidad no se cuenta con una metodología exclusiva para estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de estos microorganismos. En este estudio se empleó el método recomendado por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) con algunas modificaciones.



## II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

### 2.1 BRUCELOSIS

Es una zoonosis que prácticamente se encuentra distribuida en todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo y es causa de grandes pérdidas para el sector salud (por los costos del tratamiento y la incapacidad para el trabajo) y para el sector pecuario (al disminuir la productividad de los animales). Se trata de unos de los problemas de salud humana y animal más graves que enfrentan varios países del mundo. Es una enfermedad que a la fecha no es diagnosticada ni tratada adecuadamente, no obstante, se sabe que afecta a la mayoría de los animales domésticos y a algunos de los animales silvestres por lo que su control y posible eliminación dependen en mucho de la cooperación que se logre entre todos los sectores de la sociedad (1,2).

### 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Estos microorganismos son cocobacilos o bacilos cortos (0.6 a 1.5  $\mu\text{m}$  por 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$ ) gramnegativos, que frecuentemente requieren de un mínimo de tres minutos de exposición al colorante de contraste (safranina) para obtener una buena definición, son patógenos intracelulares facultativos, exigentes desde el punto de vista nutricional, inmóviles, no esporulados, se pueden encontrar solos o en grupos.

Los miembros de este género comprenden un grupo genético estrechamente relacionado, con una proporción guanina-citocina en todas las especies de entre 56-58 mol %. Los estudios inmunológicos y de hibridación ADN/ADN y rARN/ADN han mostrado que es un género con escasa diferencia interna. La clasificación actual se basa en el estudio de sus propiedades bioquímicas, oxidativas, sensibilidad a fagos, aglutinación con sueros monoespecíficos y crecimiento en presencia de colorantes. Con base en estas pruebas ha llevado a la subdivisión del género *Brucella* en seis especies con sus diferentes biovariedades (Tabla 1). De las seis especies identificadas, cuatro de ellas se asocian a la brucelosis humana: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis* y *Brucella suis* (1,3,4).

### MORFOLOGÍA COLONIAL DEL GÉNERO *Brucella*

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL
AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Las cepas lisas (S) producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidas y de color ámbar, que a la luz reflejada son brillantes, de aspecto húmedo y consistencia suave.</li> <li>✓ Las cepas rugosas (R) producen colonias semejantes a las anteriores en forma pero varían considerablemente en tamaño, color, consistencia y textura; son ligeramente opacas con superficie granular y color que va del blanco mate al amarillo o amarillo café. Las colonias son frecuentemente viscosas y difíciles de desprender del agar.</li> <li>✓ Las colonias mucoides (M) son similares a las colonias R en color y en opacidad, pero presentan textura mucóide.</li> </ul>
GELOSA SANGRE	Forman colonias circulares, pequeñas, convexas, blancas, brillantes, opacas y sin actividad hemolítica.

FUENTE: 1

TABLA 1  
**CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Brucella***

ESPECIE	BIOTIPO	OXIDASA	H <sub>2</sub> S	UREASA	TIONINA 1:25 000	TIONINA 1:50 000	SAFRANINA 1:5 000	FUCSINA 1:50 000	ANTI-A*	ANTI-M**	ANTI-R/C***
<i>Brucella melitensis</i>	1	+	-	V	+	+	+	+	-	+	-
	2	+	-	V	+	+	+	+	+	-	-
	3	+	-	V	+	+	+	+	+	+	-
<i>Brucella abortus</i>	1	+	+	1-2 h	-	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	1-2 h	-	-	V	-	+	-	-
	3	+	+	1-2 h	+	+	+	-	+	-	-
	4	+	+	1-2 h	-	-	+	(+)	-	+	-
	5	+	+	1-2 h	-	+	+	+	-	+	-
	6	+	+	1-2 h	-	+	+	+	+	-	-
<i>Brucella suis</i>	9	+	+	1-2 h	-	-	+	+	-	+	-
	1	+	+	0-30 min	+	+	-	(-)	+	-	-
	2	+	-	0-30 min	-	+	-	-	+	-	-
	3	+	-	0-30 min	+	+	-	+	+	+	-
	4	+	-	0-30 min	+	+	-	(-)	+	+	-
5	+	-	0-30 min	+	+	-	-	-	+	-	
<i>Brucella canis</i>	NO	+	-	0-30 min	+	+	+	+	-	-	+
<i>Brucella ovis</i>	NO	-	-	-	+	+	-	(-)	-	-	+
<i>Brucella neotomae</i>	NO	+	+	0-30 min	-	-	-	-	+	-	-

+ POSITIVO  
 - NEGATIVO  
 v VARIABLE. 50% POSITIVOS  
 +(-) VARIABLE. LA MAYORÍA POSITIVOS  
 -(-) VARIABLE. LA MAYORÍA NEGATIVOS  
 \* FRACCIÓN A DEL LPS (SÓLO CEPAS LISAS)  
 \*\* FRACCIÓN M DEL LPS (SÓLO CEPAS LISAS)  
 \*\*\* ANTIGENO DE CEPAS RUGOSAS

FUENTE:1

### 2.3 FACTORES DE PATOGENICIDAD

Las brucelas tienen varios mecanismos de patogenicidad los cuales no están bien definidos. Se sabe que es capaz de invadir las membranas mucosas, resistir los efectos letales del plasma sanguíneo normal, promover su propio ingreso a las células fagocíticas, así como replicarse en el interior de las células especializadas de la placenta de animales. Las cepas cuyas colonias son lisas, debido a que la bacteria tiene en su superficie abundante lipopolisacárido (LPS), son más virulentas que las rugosas que son deficientes de LPS. La supervivencia intracelular de las bacterias lisas se relaciona con su capacidad para evitar o limitar la fusión entre el fagosoma y los lisosomas (1,4,12).

### 2.4 PATOGENIA

El aparato digestivo constituye la vía de entrada más frecuente (ingestión de leche contaminada) pero puede penetrar al organismo a través de escoriaciones de la piel (contacto con tejidos animales contaminados), a través de las membranas mucosas (conjuntiva) y por las vías respiratorias mediante inhalación (5-11).

Cualquiera que sea la vía de entrada, invade a través de los linfáticos y es transportada dentro de los leucocitos polimorfonucleares en los que se multiplica. Llega a los ganglios linfáticos regionales en donde una parte de las bacterias es destruida, liberando material antigénico que activa el mecanismo formador de anticuerpos y condiciona la hipersensibilidad específica de los fagocitos mononucleares. Las bacterias que no son destruidas se multiplican dentro de los macrófagos hasta provocar la lisis de los mismos y al estar libres son más fácilmente fagocitadas e incrementan su capacidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos.

Una vez superada la barrera linfática, llegan a la circulación sistémica a través del conducto torácico y se localizan principalmente en las células del sistema reticuloendotelial del hígado, bazo, médula ósea, ganglios linfáticos y riñón. Las células invadidas tienden a agruparse formando nódulos en los que aparecen células epiteliales y se rodean de linfocitos formando lesiones granulomatosas.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son determinadas en gran parte por la liberación de una potente endotoxina y por el grado de hipersensibilidad a los antígenos brucelares.

La liberación de bacterias de la célula infectada puede sobrepasar la capacidad fagocítica, llegando a una fase de multiplicación extracelular, que puede ser importante; cuando los mecanismos inmunes, humoral y celular, ayudados por el desarrollo de tolerancia a la endotoxina y por desensibilización parcial de los tejidos debido al exceso de antígeno, controlan la infección, ésta vuelve a ser predominantemente intracelular. Si las bacterias no son eliminadas por completo y persisten pequeños focos de infección inaccesibles a las defensas humoral y celular, periódicamente liberan organismos y endotoxinas a la circulación, la enfermedad adquiere carácter de cronicidad (4,12).

## 2.5 CUADRO CLÍNICO

La brucelosis es una enfermedad sistémica que se caracteriza por su extraordinario polimorfismo, se puede presentar cefalea, calosfríos, malestar general, anorexia, fiebre, mialgias y artralgias. Los signos clínicos habituales son fiebre, linfadenopatía moderada y ocasionalmente hepatoesplenomegalia (4,13-15). Para que quede más clara la poca especificidad del cuadro clínico a continuación se presentan dos casos que tuvieron lugar en la República Mexicana.

### Caso 1.

Mujer de 44 años que radica en la Ciudad de México, no viajó fuera de la misma en el último año, seis meses antes se le había diagnosticado trombocitosis y leucopenia. Historia de síndrome febril de ocho meses de evolución tratado como fiebre tifoidea en varias ocasiones y con diversos fármacos. Persistía con fiebre intermitente hasta de 40°C y diaforesis profusa de predominio nocturno. Presentó elevación de pruebas de función hepática cuatro veces de lo normal y DHL (deshidrogenasa láctica) cinco veces de lo normal. Del mielocultivo se aisló *Brucella abortus*, se trató con dicloxacilina y estreptomocina. A un año del tratamiento permanece asintomática (13).

### Caso 2.

Hombre de 48 años, residente de Guanajuato, Gto. Cuadro clínico de tres años de evolución con hipertermia no cuantificada, de predominio nocturno asociada a diaforesis. Tomó múltiples antibióticos con lo cual cedían los síntomas por periodos prolongados. Cinco meses antes de ser diagnosticada la brucelosis inició con parestesias en miembros pélvicos y dolor lumbar intenso, una TC (tomografía computarizada) reveló lesión destructiva de lumbar 5-sacra 1 con afectación de tejidos blandos. Recibió antifímicos durante este tiempo con discreta mejoría inicial. La exploración física evidenció lesión al nivel lumbar. Los estudios para tuberculosis fueron negativos. La serología para *Brucella* en la prueba estándar fue positiva 1:800 y en presencia de 2-mercaptoetanol 1:400. Recibió tratamiento con vibramicina, estreptomocina y rifampicina. A seis meses de tratarsele, el enfermo se encuentra asintomático (13).

## 2.6 TRATAMIENTO

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención; el tratamiento del paciente sospechoso o confirmado deberá indicarse bajo vigilancia médica o por personal debidamente capacitado (16).

Los medicamentos que se utilicen en el tratamiento de la brucelosis serán conforme al esquema que se seleccione, correspondiendo:

## ESQUEMAS DE TRATAMIENTO DE BRUCELOSIS HUMANA SEGÚN LA NOM-022-SSA2-1994

<b>ESQUEMA A</b>	Tetraciclina y estreptomina. De primera elección en adultos.
<b>ESQUEMA B</b>	Rifampicina y trimetoprim con sulfametoxazol; indicado en niños, mujeres embarazadas después del primer trimestre y ancianos.
<b>ESQUEMA C</b>	Doxiciclina y rifampicina; en los casos en que se presenta resistencia a los esquemas A o B, o en los que la enfermedad presenta evolución prolongada.

FUENTE:16

### 2.7 EPIDEMIOLOGIA

Es una zoonosis ampliamente distribuida en el mundo, afectando principalmente a países con ganado caprino y ovino(13). En México, el 90% de los casos tiene su origen en caprinos; el padecimiento existe en todo el territorio nacional. Se ha encontrado que *Brucella melitensis* es el agente causal del 90% de los casos de brucelosis en México, en el país esta zoonosis es considerada la más importante por las pérdidas económicas que genera en el sector salud y en el sector pecuario (12). La brucelosis se cuenta entre las enfermedades que deberían estar ya controladas en nuestro país y todavía afecta anualmente aproximadamente al 8% de la población ganadera del país, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores y es causa de una zoonosis muy seria con alrededor de tres mil personas afectadas anualmente (Tabla 2)(1).

**TABLA 2**

### CASOS ANUALES DE BRUCELOSIS EN MÉXICO

AÑO	No. DE CASOS
1988	5063
1989	4025
1990	3827
1991	3645
1992	3972
1993	2888
1994	3518
1995	2699
1996	3362
1997	3387

OBTENIDO DE: 17

## 2.8 ANTIMICROBIANOS

Se inicia aquí el estudio de las principales armas de que dispone el médico para la lucha contra la infección, tratando de los compuestos químicos con acción antimicrobiana que son producidos por microorganismos vivos (antibióticos) u obtenidos por síntesis química (quimioterapéuticos), si bien la tendencia actual es la de agruparlos bajo el título de **agentes antimicrobianos** (19).

### 2.8.1 CLASIFICACIÓN

Los criterios de clasificación son diversos, lo que origina varias claves que han permitido agruparlos según su origen, actividad, espectro de acción, etc.

#### DE ACUERDO A SU ORIGEN

ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
Biológicos	Son producidos por microorganismos (penicilina).
Sintéticos	Son producidos exclusivamente por síntesis química (nitrofuranos, sulfamidas).
Semisintéticos	Sobre el núcleo básico del antibiótico, producido por el microorganismo se engarza en la posición más adecuada radicales obtenidos por síntesis confiriendo mejora del espectro, de la farmacocinética, disminución de la toxicidad, etc.

OBTENIDO DE: 19

#### POR EL ESPECTRO DE ACCIÓN

En relación con el tipo de microorganismos que inactivan, se clasifican en: antiprotozoarios, antiviricos, antifúngicos y antibacterianos. Este último grupo es el que se desarrollará ampliamente. Cuando se habla del espectro de los antimicrobianos se acostumbra dividirlos en:

De amplio espectro	Interfieren en el crecimiento de numerosas especies bacterianas (cloramfenicol, tetraciclinas).
De corto espectro	Sólo tienen un comportamiento eficaz frente a un número limitado de especies (polimixinas).

OBTENIDO DE: 19

## POR EL MECANISMO DE ACCIÓN

### Inhiben la síntesis de la pared celular

- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Vancomicina
- Ristocetina
- Bacitracina
- Cicloserina

### Alteran la permeabilidad de la membrana citoplásmica

- Nistatina
- Colistina
- Tirotricina
- Gramicidina

### Inhiben la síntesis proteica

- Tetraciclinas
- Aminoglucósidos
- Cloramfenicol
- Estreptomicina
- Macrólidos
- Lincosamida

### Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

- Ácido nalidixico
- Rifampicina
- Quinolonas

### Con actividad antimetabólica

- Sulfamidas
- Sulfonas

FUENTE: Modificado de 14 y 18

## 2.8.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

Para que un antimicrobiano ejerza su acción, es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre a las bacterias y alcance intracelularmente la concentración necesaria. La entrada en la bacteria se puede lograr por difusión o transporte activo. Una vez dentro del microorganismo, la actividad del antibiótico puede ser: bacteriostática o bactericida.

En el aspecto molecular los antimicrobianos de uso en clínica pueden ejercer su acción en las siguientes estructuras o funciones (Figura 1):

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
2. Alteración de la membrana citoplásmica.
3. Inhibición de la síntesis proteica.
4. Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.
5. Con actividad antimetabólica.

### Inhibición de la síntesis de la pared celular

Entre las numerosas e importantes funciones que se atribuyen a la pared celular, estructura obligada de las bacterias, destaca la función de ser elemento protector de su integridad anatomofisiológica. En este sentido es vital puesto que las bacterias tienen una gran presión osmótica interna, más las grampositivas ( $\approx 20$  atmósferas) que las gramnegativas ( $\approx 5$  atmósferas), y sin esta estructura se condicionaría su destrucción por un

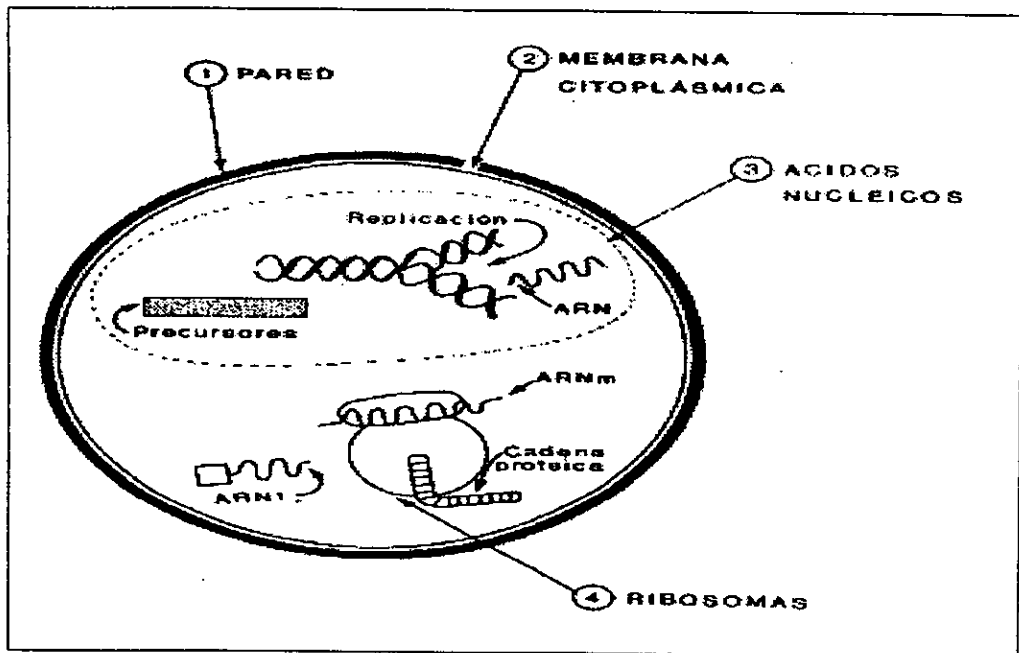


Figura1. Representación esquemática de los puntos de acción de los antimicrobianos  
FUENTE: 19

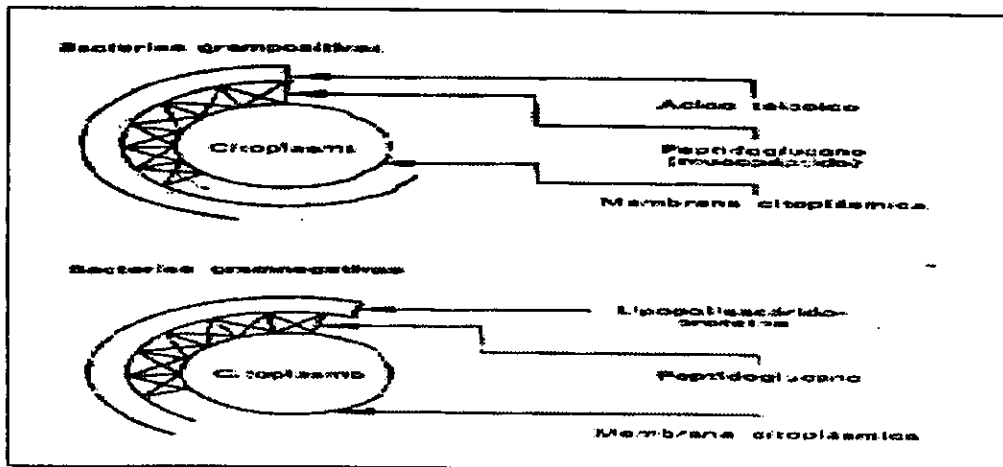


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas.  
FUENTE: 18



estallido en un medio normal (Figura 2). Las penicilinas son compuestos bactericidas que se unen a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) interfiriendo en la síntesis de la pared bacteriana. La siguiente descripción ilustra la forma de bloqueo de la síntesis de la pared bacteriana por las penicilinas y antibióticos relacionados. La pared bacteriana consiste en cadenas de un péptidoglucano formado por unidades alternantes de N-acetilglucosamida y ácido N-acetilmurámico; este último tiene una "cola" que consiste en un pentapéptido que termina en alanina-D-alanina. Estos péptidoglucanos presentan uniones cruzadas constituidas por puentes de penicilina (Figura 3). En los experimentos de Park, se acumulaba un nucleótido en el caldo de cultivo de bacterias tratadas con penicilina. La síntesis de este nucleótido (UDP-ácido N-acetilmurámico-pentapéptido) es el primer paso en la síntesis de la pared bacteriana. El segundo paso es la formación de los péptidoglucanos lineales y el paso final está constituido por la formación de las uniones cruzadas entre estas cadenas. Se conocen diversos compuestos que inhiben las reacciones enzimáticas de cada uno de estos pasos, los cuales son antibióticos clínicamente útiles (Figura 4). La formación de las uniones cruzadas se realiza mediante una transpeptidasa, que también corta una D-alanina terminal. Las penicilinas y cefalosporinas se fijan a esta enzima; además, se producen modificaciones en la morfología colonial. Finalmente, se produce la lisis celular luego de la liberación de mureína hidrolasas, que degradan la pared celular preformada. Estas hidrolasas se encuentran en la pared de las células, pero normalmente su actividad está reprimida (Figura 5) (18-21).

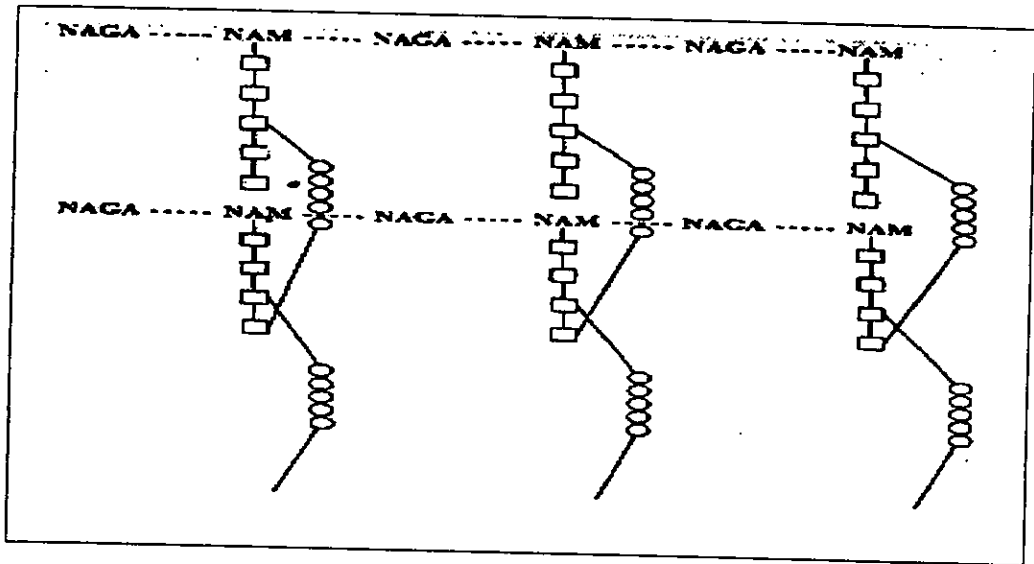


Figura 3. Estructura molecular de la pared bacteriana.  
FUENTE: 20

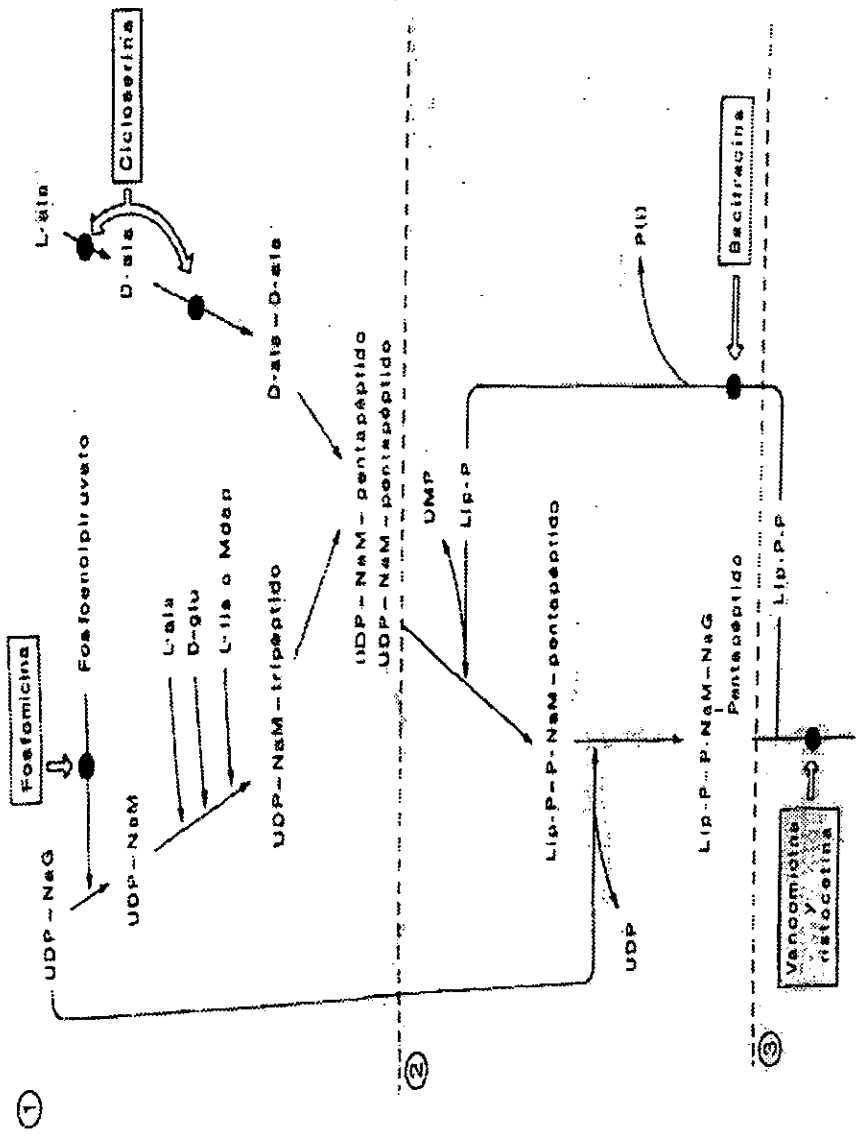


Figura 4. Síntesis de la pared bacteriana  
FUENTE: 19

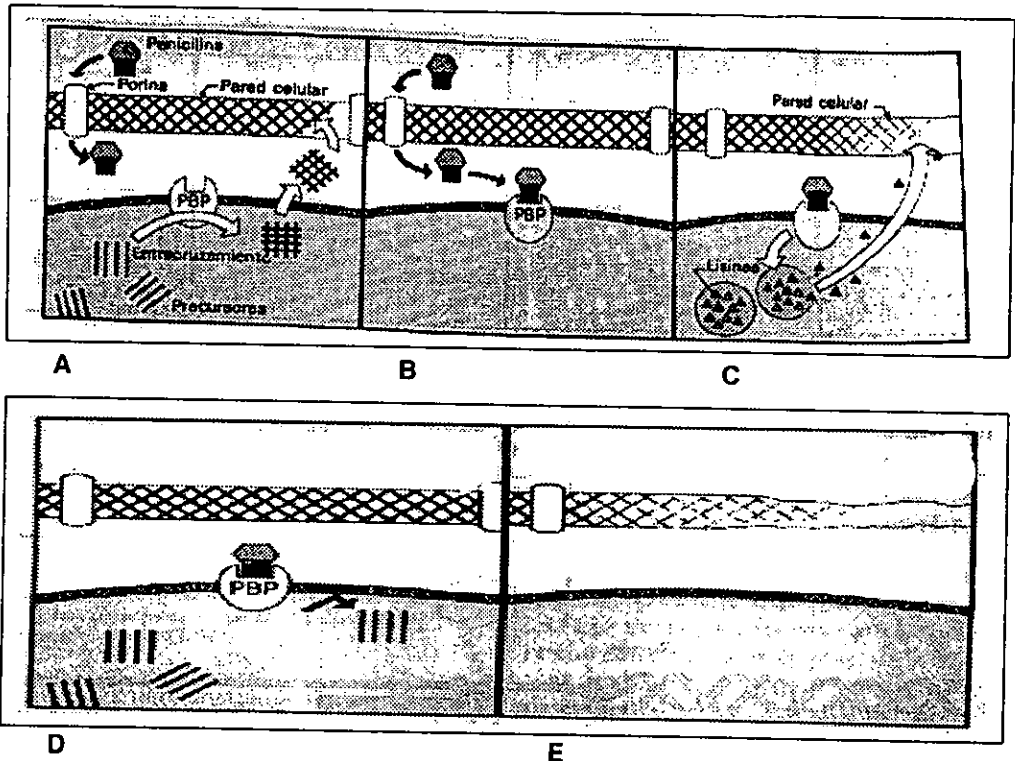


Figura 5. Inhibición de la síntesis de la pared celular. A. Entrecruzamiento de los precursores por la proteína de unión a la penicilina (PBP) e incorporación a la pared celular. B. La penicilina entra a la célula a través de las porinas y se une a la PBP. C. La unión da lugar a la liberación de autolisinas que degradan la pared celular preformada. D. Después de la unión de la penicilina a la PBP ésta ya no puede sintetizar las proteínas necesarias para la integridad de la pared celular. E. La pared celular pierde su integridad y no puede mantener la presión osmótica.

FUENTE 21

### Alteración de la membrana citoplásmica

La membrana citoplásmica de las bacterias desempeña dos funciones principales: 1) bioenergética y 2) de separación, es decir, de filtración selectiva. La membrana citoplásmica es la barrera osmótica de la célula que impide la entrada de muchas células hidrofílicas. La membrana es la sede de diversos sistemas enzimáticos, incluyendo los del sistema citocromo y el ciclo del ácido tricarboxílico. De este modo ejerce la misma función que las mitocondrias de los organismos superiores (18). Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, permiten la salida de iones  $K^+$  y macromoléculas como los ácidos nucleicos y causan un efecto lítico (Figura 6). Los antibióticos utilizados en clínica, que actúan modificando la membrana celular, son las polimixinas y los

polienos. Las polimixinas se comportan como detergentes catiónicos; son polipéptidos con un extremo liposoluble y otro hidrosoluble, el primero se une a los fosfolípidos de la membrana citoplásmica bacteriana y el segundo penetra en la parte hidrofílica. De esta forma se desorganiza la estructura y aumenta la permeabilidad, con la pérdida de metabolitos esenciales y muerte bacteriana como resultado final. Las bacterias más susceptibles son las que tienen en su membrana un mayor contenido de fosfolípidos (gramnegativas). La actividad detergente no ocurre si el antibiótico es incapaz de penetrar a través de la pared celular, como es el caso de las bacterias grampositivas que tienen una pared celular muy gruesa (Figura 7) (18,19,21).

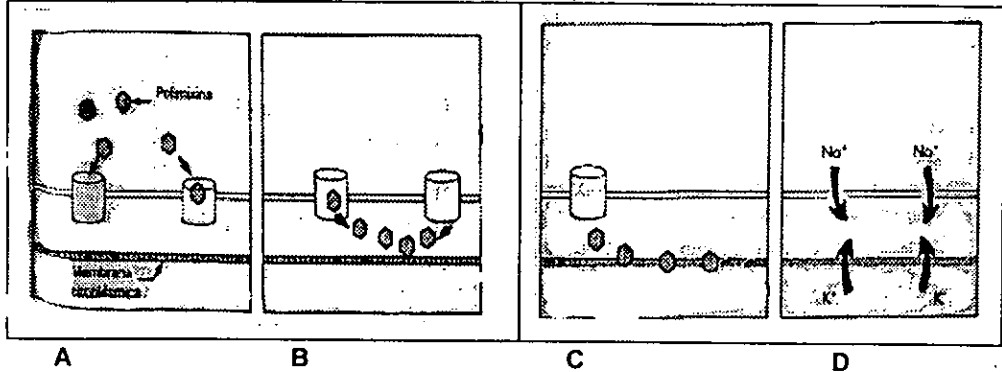


Figura 6. Alteración de la membrana celular. A. Célula bacteriana, B. Penetración de la polimixina en la membrana citoplásmica, C. Alteración de la membrana citoplásmica por efecto detergente, D. Pérdida de la integridad celular con muerte celular.

FUENTE: 21

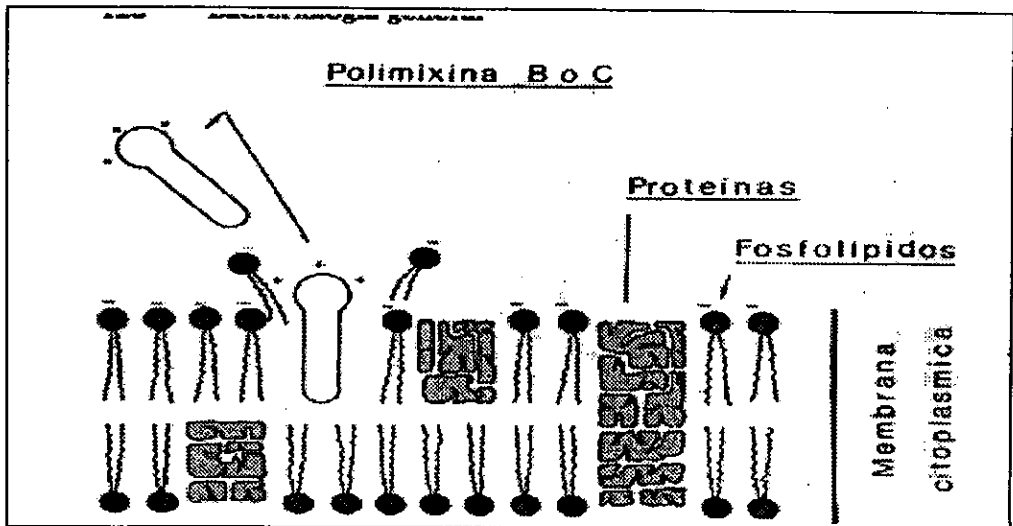


Figura 7. Efecto de la polimixina. FUENTE: 19

### Inhibición de la síntesis proteica

Muchos de los antibióticos usados comúnmente inhiben la síntesis de proteínas. En general estos antibióticos inhiben en forma selectiva la síntesis de proteínas en los microorganismos, usualmente por fijación de las subunidades ribosomales (Tabla 3). En la síntesis proteica microbiana normal, el mensaje del RNAm es "leído" simultáneamente por varios ribosomas que son colocados a lo largo de la tira de RNAm, estos son llamados polisomas.

TABLA 3

### INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA

ANTIBIÓTICO	MECANISMO
AMINOGLUCÓSIDOS	Se fijan a la subunidad ribosomal 30S
TETRACICLINAS	Inhiben la fijación del aminoacil-RNAt a la subunidad ribosomal 30S; también posee una fuerte afinidad por los policationes que podría tener una cierta relación con su capacidad para bloquear la síntesis proteica.
CLORAMFENICOL LINCOMICINA	Inhiben la peptidil-sintetasa en la subunidad ribosomal 50S impidiendo así la formación del dipéptido inicial.
ERITROMICINA	Inhibe la traslocación del peptidil-RNAt desde el sitio "A" al "P".
CICLOHEXIMIDA	Interacciona directamente con la enzima traslocasa que participa en la reacción de traslocación.

En términos generales, una vez que el antibiótico entra en la célula y atraviesa la membrana celular, se une a una de las subunidades ribosómicas (depende del tipo de antibiótico); en consecuencia, algunos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas, otros detienen la elongación de las proteínas recién producidas y, por último, algunos deforman las proteínas sintetizadas (Figura 8)(21).

### Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Las sulfamidas, ácido para-aminosalicílico (PAS), sulfonas y diaminopirimidinas (trimetoprim y pirimetaminas) interfieren en la síntesis de bases las cuales son fundamentales para la obtención de nuevos ácidos nucleicos.

En la figura 10 se observa la vía metabólica por la que se forman el ácido fólico (dihidrofólico) y folínico (tetrahidrofólico) y, consecuentemente, las pirimidinas, purinas y algunos amonoácidos.

Las quinolonas interfieren en la síntesis de DNA por inhibición de la DNA girasa. La transcripción es afectada por la rifampicina, la cual se une fuertemente a la RNA-polimerasa dependiente de DNA; así, este antibacteriano interfiere en la iniciación del proceso y no actúa si ya existe la elongación (Figura 9)(18-22).

### Actividad antimetabólica o antagonismo

En general, estos agentes antimicrobianos son estructuralmente análogos a los metabolitos esenciales para las células microbianas. Las sulfamidas, el ácido p-aminosalicílico (PAS) y las sulfonas tienen una estructura semejante a la del ácido p-aminobenzoico (PABA), un compuesto esencial en el proceso biosintético de ácido fólico.

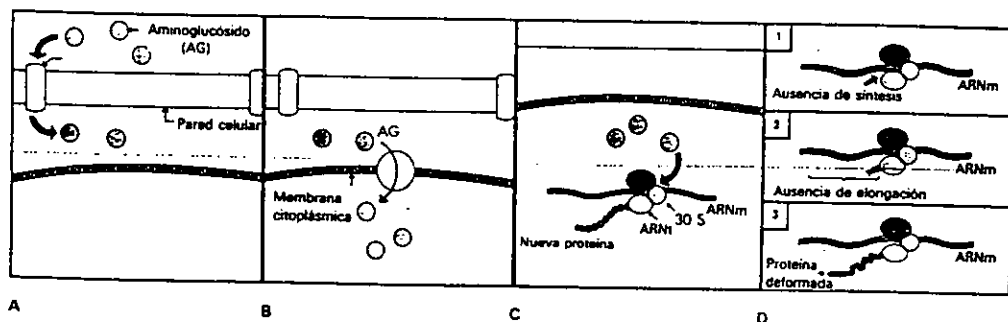
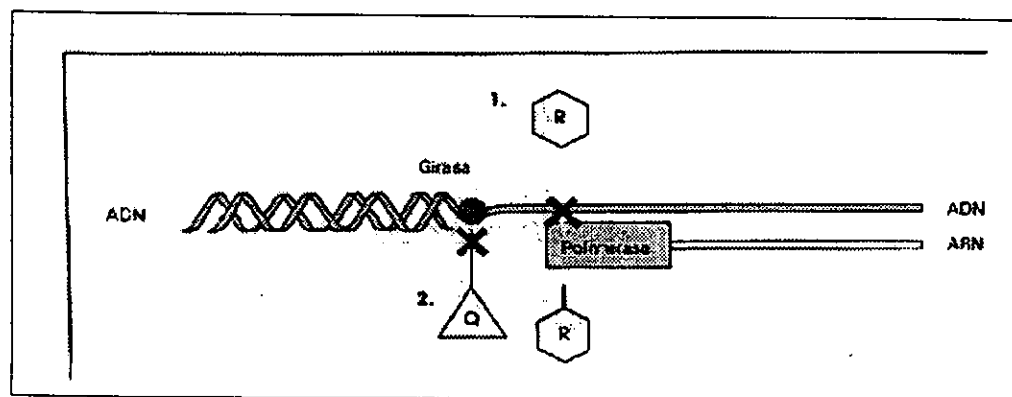
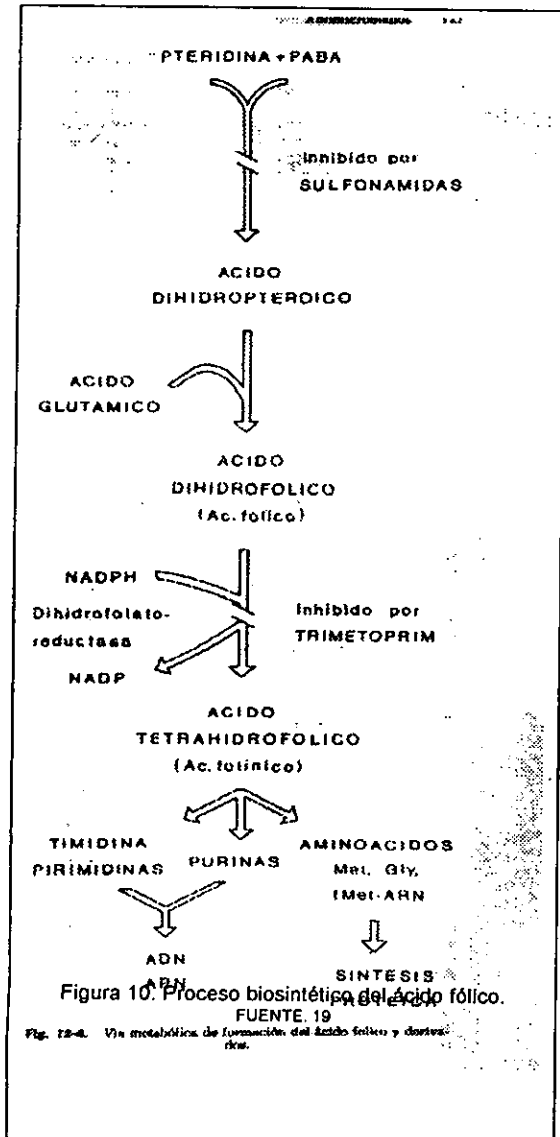


Figura 8. Inhibición de la síntesis de proteínas. A. El aminoglucósido (AG) entra en la bacteria a través de las porinas, B. transporta activo del AG a través de la membrana citoplásmica. C. Unión de AG a la subunidad ribosómica de 30S, D. Como consecuencia de la unión: (1) no se inicia la síntesis de proteínas, (2) no se produce la elongación de proteínas, (3) se produce una lectura falsa de RNAi que da lugar a proteínas deformadas.

FUENTE: 21



Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. 1. La rifampicina ( R )se une a la RNA-polimerasa dependiente de DNA e inhibe la síntesis de RNA, 2. La quinolona (Q) inhibe la DNA-girasa e impide el superenrollamiento de DNA.  
FUENTE: 21



Todas las células bacterianas como las de los mamíferos necesitan ácido fólico para su desarrollo. Las células animales son incapaces de sintetizarlo, y dicho ácido tiene que suministrarse en la dieta y ser transportado activamente en la célula. En la mayor parte de las células bacterianas el ácido fólico no es transportado a través de la pared celular, y a de ser sintetizado por los organismos. En la figura 10 se representa el proceso de síntesis del ácido fólico. Las sulfonas, el PAS y las sulfamidas concurren con el PABA y se incorporan al proceso biosintético, originando un producto análogo al ácido fólico que es metabólicamente inactivo y da lugar, por consiguiente, al cese del desarrollo microbiano. Además, el compuesto folato análogo producido puede inhibir las enzimas del proceso. El trimetoprim actúa específicamente sobre una enzima, la ácido-dihidrofólico reductasa.

## 2.9 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Clásicamente en clínica se considera que una cepa bacteriana es resistente a un antibiótico cuando necesita para inhibirse concentraciones de fármaco superiores a la concentración que el antibiótico puede alcanzar en el sitio de la infección (19). La capacidad de muchos microorganismos para desarrollar resistencia frente a las drogas quimioterapéuticas ofrece una amenaza para su futura utilidad y exige tanto recursos como ingenio para enfrentar y contrarrestar este problema. Para que el uso de estos agentes sea exitoso, se debe abandonar la noción de que afectan solamente a los microorganismos contra los cuales están dirigidos en cualquier momento en particular; y de que independientemente cuán temerariamente se los use, los microorganismos son poderosos para responder (23).

### 2.9.1 TIPOS DE RESISTENCIA

#### Origen no genético

Es más correcto denominarla insensibilidad natural (19). Este tipo de resistencia suele atribuirse a la ausencia de los **lugares de destino** del fármaco dentro de la bacteria. Si, por ejemplo, no existen receptores de unión al fármaco o falta la vía metabólica necesaria para que éste desarrolle su actividad, las bacterias mostrarán una resistencia intrínseca (la resistencia a vancomicina de los bacilos gramnegativos) (21-24).

#### Origen genético

Se debe a modificaciones en la carga genética de las bacterias, que pueden tener lugar en el DNA cromosómico (resistencia cromosómica) o en el DNA extracromosómico (resistencia extracromosómica o plasmídica) (19).

- ✓ **Cromosómica.** Se desarrolla como resultante de la mutación espontánea en un *locus* que controla la susceptibilidad a un antimicrobiano determinado. La presencia del medicamento sirve como mecanismo selector para la supresión de microorganismos sensibles y permite el desarrollo de mutantes resistentes a los medicamentos. La mutación espontánea ocurre con frecuencia de  $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  (es decir, una bacteria cada 100 millones a un billón) y, por lo tanto, es una causa rara de la aparición de la resistencia clínica al medicamento en un enfermo determinado. Sin embargo, mutantes cromosómicos resistentes a rifampicina, ocurren con bastante frecuencia ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$ ). En consecuencia, el tratamiento de infecciones bacterianas con rifampicina como medicamento único falla con frecuencia (24). El conocimiento de la velocidad de mutación, así como el sitio de ataque de las distintas drogas, es importante en un enfoque racional de la quimioterapia (23).



- ✓ **Extracromosómica.** La información genética que controla la resistencia bacteriana a drogas aparece tanto en el cromosoma bacteriano como en el DNA de los plásmidos. El rasgo de la resistencia puede ser transmitido de estos *loci* por la transferencia del material genético de una célula resistente a una sensible por transformación, conjugación o transducción (23).

**1. Transformación.** La transformación depende de la capacidad de las células bacterianas para absorber DNA del ambiente extracelular; constituye un proceso complejo en que se integran varias etapas:

A) Captación del DNA. Durante el proceso de transformación, las bacterias competentes fijan primero reversiblemente el DNA; sin embargo, rápidamente, la fijación se convierte en irreversible.

B) Integración del DNA incorporado. El DNA en transformación está unido a la superficie de la célula por una proteína de unión del DNA, después de lo cual una nucleasa degrada una cadena mientras se fija la otra. EL DNA incorporado se asocia con una proteína de competencia específica, que permanece unida al DNA, evitando presumiblemente un ataque por una nucleasa, hasta que llega al cromosoma, donde lo captura la proteína RecA. Entonces el DNA es integrado al receptor (Figura 11) (26).

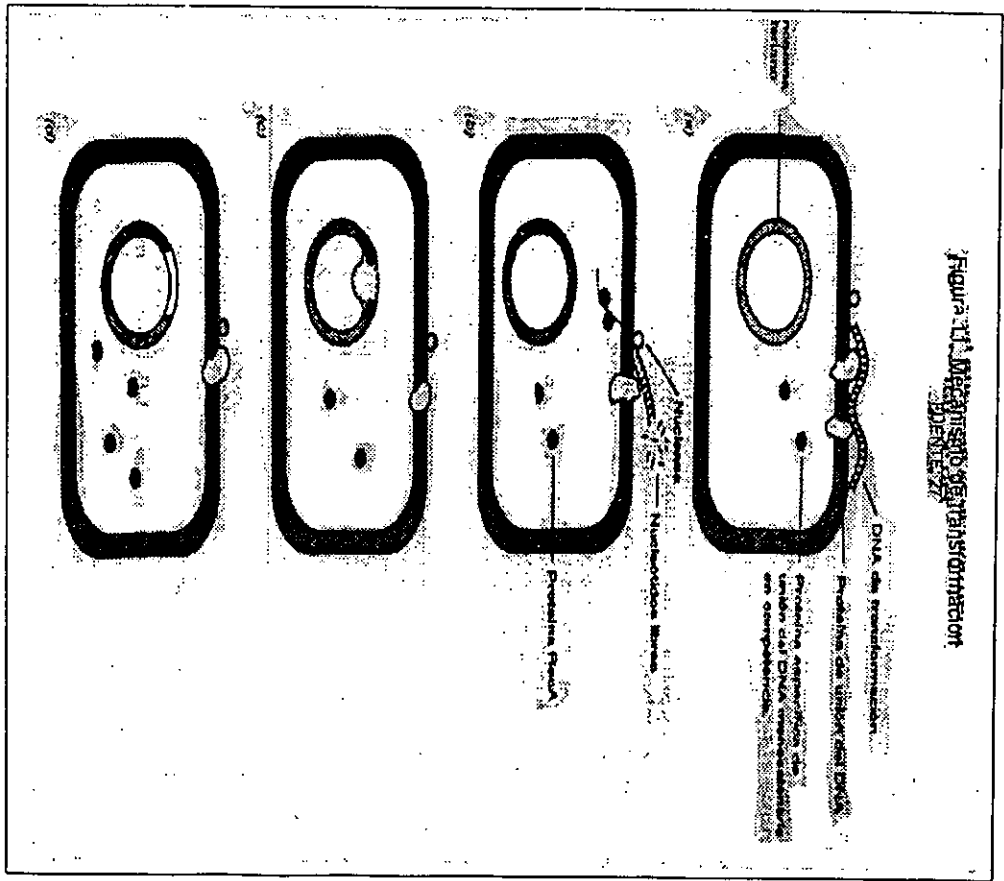
**2. Transducción.** La transducción es el proceso mediante el cual un bacteriófago participa en la transferencia del material genético desde una bacteria donadora hacia otra receptora. La transferencia de los genes del huésped por los virus puede tener lugar en dos formas:

A) Transducción especializada; en este caso, un grupo específico de los genes del huésped es integrado directamente en el genoma viral, muchas veces sustituyendo a alguno de los genes virales, y es transferido a la célula receptora durante la lisogenización.

B) Transducción generalizada; los genes del huésped quedan como una parte de la partícula viral madura en lugar del genoma viral o además de él (25,27). La partícula viral transductora es defectuosa en ambos casos, y es capaz de producir lisis del huésped, probablemente debido a la falta de algunos genes virales.

**3. Conjugación.** La conjugación bacteriana o apareamiento, es un proceso de transferencia genética que supone contacto célula a célula. En la conjugación, la célula donadora transmite información genética a la célula receptora mediante un apareamiento específico entre ambas. La célula donadora, en virtud de que posee un plásmido conjugativo, posee una estructura en la superficie, el **pelo sexual**, que interviene en la formación de par. Los pelos sexuales hacen posible el contacto específico entre las células donadora y receptora y entonces se retraen, impulsando a las dos células a que se unan de modo que se pueda formar un puente a través del cual pasa el DNA de una de las células a la otra. La serie completa de fenómenos es probablemente disparada por un contacto célula a célula; en ese momento el círculo de DNA se abre, y son transferidas una cadena parenteral y una nueva. De acuerdo a este modelo, la transferencia puede tener lugar sólo al mismo tiempo que ocurre la síntesis del DNA (25).

Figura 11. Mecanismo de síntesis de DNA.



## 2.9.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA

El mensaje genético que codifica la resistencia a los antibióticos determina a nivel bioquímico, molecular o estructural, varios mecanismos que son responsables en último lugar de que aquella se manifieste. Los más importantes son:

1. Disminución de la permeabilidad celular. La permeabilidad alterada a agentes antimicrobianos puede involucrar cambios en los receptores específicos para la droga, pérdida de la capacidad para el transporte activo a través de la membrana celular o cambios estructurales en uno o más componentes de la envoltura celular que influyen en la permeabilidad en una u otra forma relativamente no específica. Esta es la forma más comúnmente hallada de resistencia a tetraciclinas (Figura 12A) (19,23,28-30).
2. Por modificación enzimática. Puede ser por hidrólisis y detoxificación. Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas hidrolíticas que destruyen el anillo  $\beta$ -lactámico de las  $\beta$ -lactaminas, inactivándolas y determinando la aparición de resistencia a penicilinas y cefalosporinas (Figura 12B). Las enzimas inactivantes intervienen en la resistencia a los aminoglucósidos y cloramfenicol. Como estos antimicrobianos son tóxicos para las bacterias, éstas han desarrollado mecanismos enzimáticos que las inactivan, haciéndolos ineficaces mediante la unión de distintos radicales: grupos acetilo y adenilo, y radicales fosfóricos. Las enzimas que detoxifican a los aminoglucósidos son fosforilasas, acetiltransferasas y adenilasas (Figura 12D).
3. Por modificación del sitio receptor del agente quimioterapéutico. Por ejemplo, modificando la estructura de los ribosomas en el caso de la resistencia de la lincomicina, eritromicina o aminoglucósidos y por alteraciones en las PBP en los  $\beta$ -lactámicos. Por modificación de los sistemas enzimáticos de la bacteria. Esto ocurre con la RNA-polimerasa en la resistencia a la rifampicina y con la folatosintetasa en la resistencia a las sulfamidaz (19,21,23,25,28).

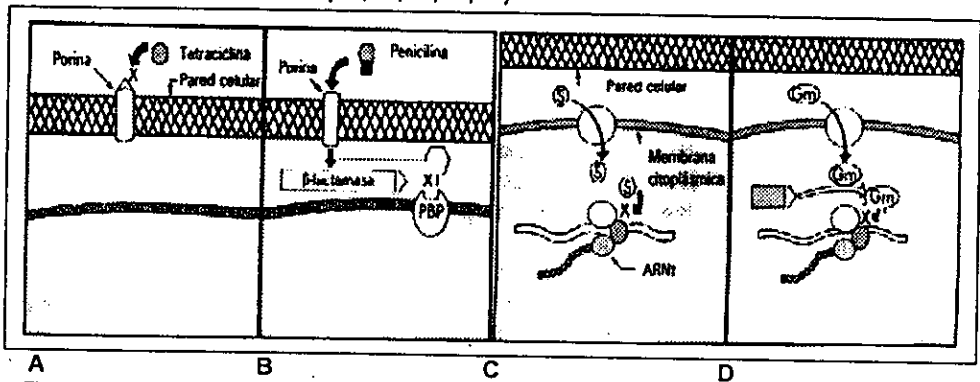


Figura 12. A. Modificación de la porina, de tal modo que la bacteria es impermeable al antibiótico. B. La enzima inactiva la penicilina, abriendo el anillo  $\beta$ -lactámico, que no se puede unir a PBP. C. Se observa una disminución de la afinidad de la estreptomicina (S) por el lugar de unión al ribosoma. D. La enzima acetila la gentamicina, por lo que ésta no se une al ribosoma.

## 2.10. MÉTODOS PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Al seleccionar el mejor antimicrobiano para tratar una infección se deben tomar en cuenta varias consideraciones:

- ✓ Conocimiento de la susceptibilidad *in vitro* del microorganismo infectante a los antimicrobianos apropiados.
- ✓ Relación de la susceptibilidad de la cepa con la de otros miembros de la misma especie.
- ✓ Propiedades farmacológicas, incluso toxicidad, unión a proteínas, distribución, absorción y excreción, en particular en circunstancias de insuficiencia hepática o renal existente o en desarrollo.
- ✓ Experiencia clínica previa de eficacia en el tratamiento de infecciones debidas al mismo agente patógeno.
- ✓ Naturaleza del proceso patológico subyacente, su historia natural y su influencia sobre la quimioterapia.
- ✓ El estado de inmunidad del huésped.

El papel del laboratorio en la selección y supervisión de la quimioterapia lo expresó sucintamente Theodore G. Anderson: *"al seleccionar un agente antimicrobiano terapéutico, es responsabilidad del médico tomar en consideración las características farmacológicas de las diversas drogas, así como su relativa efectividad antimicrobiana. La responsabilidad del laboratorio es dar información obtenida de pruebas estandarizadas in vitro, sobre la actividad de agentes antimicrobianos apropiados contra el microorganismo en cuestión"* (38). Es importante destacar que las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana pretenden ser una guía para el clínico, no una garantía de la eficacia del agente antimicrobiano.

### 2.10.1. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

En general, los métodos para pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos se clasifican de acuerdo al principio en que se basan los mismos:

- ✓ Métodos de difusión.
- ✓ Métodos de dilución.

En cada clasificación hay modificaciones en el método, lo que hace que se cuente con varios procedimientos específicos (tabla 4).

TABLA 4

MÉTODOS DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSIÓN	
Método de Kirby-Bauer	Establece que sólo se use medio de Mueller-Hinton, el inóculo se prepara a partir de 4 colonias con morfología colonial semejante que se transfieren en caldo soya tripticasa, se incuba de 2 a 5 horas a 37°C y la turbidez final debe estandarizarse con la del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. La inoculación de la placa se realiza en tres direcciones con un hisopo de algodón humedecido en la suspensión bacteriana, se deja secar la superficie del agar y se colocan los discos con antibiótico, posteriormente se incuban las placas a 35-37°C durante 16 a 18 horas y se mide en milímetros el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento; para interpretar los resultados se recurre a tablas publicadas.
Método de Ericson	Se usa medio de Mueller-Hinton o medio para prueba de sensibilidad a los antibióticos. El inóculo se prepara a partir de 10 colonias y éstas se transfieren en solución salina, las placas de agar se inoculan transfiriendo 3-5 mL de la suspensión bacteriana para que cubra toda la superficie y posteriormente se retira el exceso, se dejan secar las placas en una superficie plana durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se colocan los discos, las placas se incuban durante 15-18 h a 37°C, se mide en milímetros el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento, se interpretan los resultados de acuerdo con tablas publicadas.
Método comparativo	Se usa cualquier medio específico para pruebas de sensibilidad a los antibióticos, el inóculo se prepara en caldo nutritivo o a partir de varias colonias transferidas en solución salina con la condición de que permitan un crecimiento confluyente al sembrar en placa e incubar 24 horas, la placa se inocula en tres direcciones con un hisopo humedecido en la suspensión bacteriana, se deja secar la superficie del agar se colocan los discos, se incuba 24 h a 35-37°C, se mide el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento. La interpretación de resultados se hace considerando el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento del control y la cepa de prueba.
Método de Stokes	Se usa cualquier medio específico para pruebas de sensibilidad a los antibióticos, el inóculo se prepara en caldo nutritivo o a partir de varias colonias transferidas en solución salina con la condición de que permitan un crecimiento confluyente al sembrar en placa e incubar 24 horas, para inocular la placa ésta se divide en tres partes paralelas y en la banda central se siembra la cepa problema y en los laterales la cepa control, los discos se colocan entre los límites de las bandas y se incuban 24 h a 37°C, la interpretación de resultados considera la inhibición de la cepa problema y la cepa control.
MÉTODOS DE DILUCIÓN	
Método de dilución en caldo	Este es un macrométodo que nos permite determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) y la Concentración Bactericida Mínima (MBC), se siembran tubos con medio que ya contiene el agente antimicrobiado y posterior a incubación se siembra en placa de agar Es un método de referencia.
Método de microdilución en caldo	Es la variante del método anterior que usa microplacas en que los pozos ya tienen el medio y el agente bacteriano, esta variante del método permite probar a la vez gran número de cepas.
Método de dilución en agar.	Es el método de referencia, a diferencia de los métodos anteriores permite estudiar varias cepas a la vez y es posible detectar cepas contaminadas, nos permite determinar la MIC que en este caso es igual a la MBC.

## Selección del método para pruebas de susceptibilidad

El método más apropiado para una situación en particular depende del equipo disponible, el número y tipo de microorganismos y antimicrobianos que se van a estudiar y el propósito para el cual se va a llevar a cabo la prueba. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana pueden emplearse para:

- ✓ Probar aislamientos individuales y proporcionar una guía para la selección de la terapia.
- ✓ Estudio de la actividad y espectro de acción de nuevos agentes antimicrobianos.
- ✓ Estudiar poblaciones microbianas para documentar los cambios de los patrones de susceptibilidad bajo el efecto del uso de antimicrobianos.
- ✓ Determinar antibiogramas como marcadores epidemiológicos o para identificación presuntiva de un aislamiento.

La prueba de difusión en agar es la más usada día a día y generalmente es satisfactoria cuando:

- ✓ Es suficiente una información cualitativa simple.
- ✓ Las cepas crecen rápidamente de manera uniforme.
- ✓ Se estudia un gran número de antimicrobianos al mismo tiempo.
- ✓ Las pruebas de difusión con los agentes y microorganismos a probar se estandarizaron previamente y mostraron ser satisfactorias.

Por otra parte, las pruebas de dilución antimicrobiana se pueden requerir:

- ✓ Si son necesarias mediciones cuantitativas de susceptibilidad.
- ✓ Si las cepas son fastidiosas o de crecimiento lento.
- ✓ Cuando las pruebas de difusión mostraron ser insatisfactorias para un agente en particular o un tipo de microorganismo.
- ✓ Cuando se pretende determinar la concentración bactericida mínima.

## Categorización de susceptibilidad

**Susceptible:** Esta categoría implica que una infección debida a una cepa puede tratarse apropiadamente con la dosis del agente antimicrobiano recomendada para este tipo de infección y especie infectante a menos que esté contraindicado (44,45).

**Moderadamente susceptible:** Esta categoría incluye cepas que se pueden inhibir por concentraciones que se pueden alcanzar de ciertos agentes antimicrobianos (P.ej.  $\beta$ -lactámicos) proporcionando altas dosis o en ciertos sitios del cuerpo (P.ej. orina) donde las drogas se concentran fisiológicamente (44,45).

**Resistente:** Las cepas causantes de la infección no son inhibidas por las concentraciones sistémicas alcanzables del agente antimicrobiano con esquemas de dosificación normal y/o caen en el rango donde son probables los mecanismos de resistencia y la eficacia clínica no es segura (44,45)

## 2.11 ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DEL GÉNERO *Bruceella* A TRAVÉS DEL TIEMPO

AÑO	Nº	MÉTODO	RESULTADOS	FUENTE
<b>SULFAPIRIDINA</b>				
1939	1	I	BACTERIOSTÁTICA ACONCENTRACIONES 1:1000 y 1:10000	31
<b>PENICILINA G</b>				
1944	15	I		
1970	27	I	BACTERICIDA EN 8 DE 15 CEPAS INHIBICIÓN A CONCENTRACIONES DE 1.25-100 µg/ml	31
1986	15	II	MIC 50 1.0 µg/ml MIC 90 4.0 µg/ml RANGO 0.25-8.0 µg/ml	32
<b>AMPICILINA</b>				
1970	27	I		
1986	15	I	MIC 50 0.6 µg/ml MIC 50 1.0 µg/ml	31
<b>AMOXICILINA</b>				
1973	25	-	RANGO 1.0-16.0 µg/ml	33

(CONTINUACIÓN)				
CEFALOSPORINAS				
1982	98	III	CEFOXITINA: NO EFECTIVA N-FORMIMIDOIL TIENAMICINA: MIC50 0.25 µg/ml	31
1986	83	III	CEFTIZOXIMA, CEFTRIAZONA Y CEFOTAXIMMA: MIC50: 0.5-1.0 µg/ml MOXALATAM, CEFOPERAZONA, CEFTACIDINA, CEFUROXIMA Y AZTREONAM: MIC50 16-128.0 µg/ml	34
1986	95	III	CEFTRIACINA: RANGO 0.12-1.0 µg/ml	31
1986	104	III	MIC50 (µg/ml) CEFTIZOXIMA 0.3 CEFOTIXIMA 0.5 CEFTRIAZONA 1.2 CEFTACIDINA 6.0 CEFOTETAN 7.6	31
ESTREPTOMICINA Y OTROS AMINOGLUCÓSIDOS				
1946	40	I	ESTREPTOMICINA: RANGO 1.0-4.0 µg/ml	31
1949	24	I	ESTREPTOMICINA: RANGO 1.0-2.5 µg/ml	31
1970	27	I	25 CEPAS SUSCEPTIBLES A ESTREPTOMICINA, 2 CEPAS DE <i>B. canis</i> RESISTENTES A 15000 µg/ml MIC50 (µg/ml) GENTAMICINA 0.07 KANAMICINA 0.20 ESTREPTOMICINA 0.80	31



(CONTINUACIÓN)					
1986	15	II	GENTAMICINA TOBRAMICINA ESTREPTOMICINA AMIKACINA	MIC50 (µg/mL) 0.5 1.0 2.0 4.0	32
1986	115	III	GENTAMICINA SISOMICINA DIBETACINA ESTREPTOMICINA	MIC50 (µg/mL) 0.31 0.43 1.09 1.90	31
1989	47	I	ESTREPTOMICINA: RANGO	0.15-5.0 µg/mL	35
1993	62	III	ESTREPTOMICINA: RANGO	2.0 µg/mL 0.1-4.0 µg/mL	36
<b>TETRACICLINAS</b>					
1949	44	I	CLORTETRACICLINA: RANGO	0.6-1.5 µg/mL	31
1970	27	-	DIMETILCLORTETRACICLINA TETRACICLINA MINOCICLINA, METACICLINA, DOXICICLINA, OXITETRACICLINA Y CLORTETRACICLINA: RANGO 0.04-1.0 µg/mL	MIC50 (µg/mL) 0.005 0.005	31
1972	10	V	TETRACICLINA: RANGO	0.01-5.0 µg/mL	31
1973	25	-	TETRACILCINA: RANGO	0.1-0.8 µg/mL	33
1976	100	V	DEMOCLOCICLINA, DOXICICLINA, LIMECICLINA Y TETRACICLINA: RANGO	<1.0 µg/mL	31
1982	98	III	TETRACICLINA: RANGO	<0.25 µg/mL	31
1986	15	II	TETRACICLINA: RANGO	<0.13 µg/mL	32

(CONTINUACIÓN)				
<b>ERITROMICINA</b>				
1966	10	IV	RANGO 0.05-5.0 µg/ml	33
1970	27	I	RANGO 0.02-2.5 µg/ml	31
1986	15	-	RANGO 0.5-8.0 µg/ml MIC50 8.0 µg/ml	32
1993	-	III	RANGO 0.2-16.0 µg/ml MIC50 4.0 µg/ml MIC90 16.0 µg/ml	36
<b>RIFAMPICINA</b>				
1970	27	I	RANGO 0.02-5.0 µg/ml	31
1976	107	-	RANGO 0.15-2.50 µg/ml	31
1980	1	I	MIC 2.0 µg/ml	31
1982	98	III	RANGO 0.06-1.0 µg/ml	31
1984	31	III	RANGO 0.25-2.0 µg/ml	31
<b>TRIMETOPRIM Y SULFAMETOXAZOL</b>				
1973	25	III*	TRIMETOPRIM : MIC50 32.0 µg/ml SULFAMETOXAZOL: MIC50 2.0 µg/ml	33
1973	18	V*	TRIMETOPRIM: MIC50 15.0 µg/ml SULFAMETOXAZOL: MIC50 3.0 µg/ml	31
1984	31	III	NO SUSCEPTIBLES A TRIMETOPRIM A 64.0 µg/ml TODAS RESISTENTES A SULFAMETOXAZOL A 128.0 µg/ml	31
1985	107	-	TRIMETOPRIM: MIC<0.5 µg/ml SULFAMETOXAZOL: MIC 9.5 µg/ml	31

\* SANGRE DE CABALLO DESFIBRINADA. CONTIENE TIMIDINA-FOSFORILASA QUE INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA TIMIDINA QUE CONTIENEN EL MEDIO DE CULTIVO.

Nº NÚMERO DE CEPAS DE *Bruceella* spp QUE SE INCLUYERON EN EL ESTUDIO.

I. MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO.

II. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.

III. MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR.

IV. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA.

V. MÉTODO DE ZANJA EN PLACA.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha postulado que la susceptibilidad de los microorganismos es cambiante a través del tiempo, estos cambios son debidos a un proceso evolutivo de los microorganismos como consecuencia de la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos constantemente se encuentra en aumento, en especial en aquellas cepas aisladas de pacientes hospitalizados. Por otro lado, en los casos de bacteremias detectadas dentro de una institución de salud se recomienda iniciar tratamiento tan pronto como sea posible; la selección inicial de los antimicrobianos en estos casos y en general en todas las situaciones infecciosas se realiza con base en las características clínicas del paciente, sus antecedentes y la susceptibilidad conocida de los microorganismos **más frecuentes** según el tipo de padecimiento. La brucelosis es un padecimiento relativamente poco frecuente y sin signos patognomónicos por lo que es confundida con otros padecimientos (fiebre tifoidea, tuberculosis, faringitis, cuadros gripales, etc.) e inicialmente no es considerada por el médico como posible causa del malestar del paciente, lo que provoca sea tratada con múltiples esquemas terapéuticos antes de ser diagnosticada correctamente; estos esquemas al no ser los adecuados sólo proporcionan una aparente mejoría pero finalmente el paciente vuelve a presentar el mismo cuadro clínico y en ocasiones con diferentes manifestaciones que indican secuelas de la enfermedad (13,50).

En la búsqueda bibliográfica que se llevó a cabo, no se encontraron hasta la fecha publicaciones que reporten estudios de susceptibilidad antimicrobiana de cepas del género *Brucella* aisladas en nuestro país; por este motivo, el presente trabajo pretende estudiar este aspecto con cepas de *Brucella melitensis* aisladas en la República Mexicana, ya que a este género pertenecen aproximadamente el 90% de las cepas de *Brucella* aisladas en nuestro país (12). Para llevar a cabo lo anterior, se empleará el método de dilución en agar considerándose a éste el método más adecuado dadas las características y bondades del mismo. Las cepas se retarán con los agentes antimicrobianos recomendados en la NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención (tetraciclina, estreptomycin, rifampicina, sulfametoxazol, doxiciclina y trimetoprim; así como a dos agentes antimicrobianos que son usados ampliamente por la población mexicana (penicilina G y eritromicina).

Se espera que a partir del estudio se pueda determinar el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Brucella melitensis* aisladas a partir de humanos y animales dentro de la República Mexicana y establecer si existe diferencia entre los resultados obtenidos en nuestro estudio y los reportados en otros países. Además, se pretende determinar si existe alguna diferencia en el patrón de susceptibilidad entre las cepas de origen humano y origen animal bajo el supuesto de que en el animal no existe estímulo (antimicrobiano) para que tenga lugar la selección de cepas resistentes, siendo que en el humano sí tiene lugar este estímulo.

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de susceptibilidad de cepas de *Brucella melitensis* aisladas de humanos y animales dentro de la República Mexicana hacia los antimicrobianos recomendados en la Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994 y algunos antimicrobianos de uso común en la población mexicana (penicilina G y eritromicina) por el método de dilución en agar y observar si existe diferencia en el patrón de susceptibilidad antimicrobiana entre las cepas aisladas de humanos y aquellas aisladas de animales; a partir de lo obtenido inferir si hay selección de cepas resistentes al pasar por el ser humano y comparar los resultados obtenidos con aquellos reportados en estudios realizados en otros países.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Estandarizar el método de dilución en agar y establecer las condiciones de estudio para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Brucella* spp en el laboratorio de brucelosis del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos en este estudio con aquellos reportados en estudios realizados en otros países.
- ✓ Observar si hay diferencia en el patrón de susceptibilidad entre los biotipos de las cepas de *Brucella melitensis*.

## **V. HIPÓTESIS**

Dado que al paciente al que se le diagnostica brucelosis ha sido tratado médicamente con múltiples esquemas terapéuticos poco efectivos, es posible que se seleccionen cepas resistentes a los antimicrobianos, por lo que se espera que las cepas aisladas de animales sean más susceptibles a los antimicrobianos en estudio que las cepas aisladas de humanos.

## VI. DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETIVO

### CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### Criterios de inclusión

Cepas de *Brucella melitensis* de origen humano y animal pertenecientes a la colección de cepas del laboratorio de brucelosis que se encuentra en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

#### Criterios de exclusión

Cepas en donde la morfología colonial no se apegue a la presentada por los microorganismos pertenecientes al género *Brucella*, la prueba de aglutinación con suero polivalente anti-*Brucella* resulte negativa y la prueba con acriflavina evidencie que la cepa es no lisa.

#### Población

19 cepas de *Brucella melitensis* aisladas de animales.  
84 cepas de *Brucella melitensis* aisladas de humanos.

### TIPO DE ESTUDIO

Observacional, prospectivo, transversal y comparativo.

### VARIABLES

#### Variable independiente

Fase de crecimiento  
Tipos de cepas  
Tipos y diluciones de antimicrobiano  
Humedad  
Fase de crecimiento  
Densidad del inóculo  
Tiempo de incubación

#### Variable dependiente

Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Brucella melitensis*

## VII. MATERIAL

### SUSTANCIAS QUÍMICAS Y REACTIVOS

- ✓ Agua destilada (INDRE)
- ✓ Agar brucela (Bioxón)
- ✓ Agar bacteriológico (Dibico)
- ✓ Agar de soya tripticasa (Bioxón)
- ✓ Caldo Iso-sensitest (Oxoid)
- ✓ Extracto de levadura (Bioxón)
- ✓ Dextrosa (Difco)
- ✓ Glicerol (CTR)
- ✓ Cloruro de sodio (Reproquifin)
- ✓ Fenol (SIGMA)
- ✓ Cloruro de bario (SIGMA)
- ✓ Ácido sulfúrico (SIGMA)
- ✓ Dimetilsulfóxido (SIGMA)
- ✓ Hidróxido de sodio (J.T. Baker)
- ✓ Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker)
- ✓ Fosfato de potasio dibásico (J.T. Baker)
- ✓ Acetona (SIGMA)
- ✓ Alcohol etílico (SIGMA)
- ✓ Penicilina G sódica (SIGMA)  
Lote: 111H0079
- ✓ Eritromicina (SIGMA) Lote: 24H0050
- ✓ Estreptomocina, sulfato de. (SIGMA)  
Lote: 53H0088
- ✓ Rifampicina (SIGMA) Lote: 104H6727
- ✓ Trimetoprim (SIGMA) Lote: 60H0551
- ✓ Sulfametoxazol (SIGMA) Lote: 31H0718
- ✓ Tetraciclina, cloruro de. (SIGMA)  
Lote: 43H1092
- ✓ Doxiciclina, cloruro de. (SIGMA)  
Lote: 22H0119
- ✓ Suero polivalente anti-*Brucella* (INDRE)

### MATERIAL

- ✓ Cajas de Petri 15x100mm (Fisherbrand)\*
- ✓ Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- ✓ Filtros millipore 0.22  $\mu\text{m}$ \*
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 250 y 1000 mL
- ✓ Botellas de leche (Pyres)
- ✓ Tubos de ensayo de 12x75 mm, 15x130 mm, 15x165 mm (Pyres)
- ✓ Gradillas
- ✓ Perilla de succión
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Jeringas para insulina (Jeripak)\*
- ✓ Jeringas de 20  $\text{cm}^3$  (Jeripak)\*
- ✓ Puntas para micropipeta\*
- ✓ Probetas de 50 mL, 250 mL, 1000 mL (Pyres)
- ✓ Vasos de precipitados de 30 mL, 50 mL, 400 mL, 1000 mL (Pyres)
- ✓ Frascos goteros
- ✓ Aplicadores
- ✓ Placas de vidrio para serología
- ✓ Algodón
- ✓ Gasas
- ✓ Mechero Fischer
- ✓ Cubrebocas
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Goggles
- ✓ Guantes de asbesto
- ✓ Nivel
- ✓ Papel glassine
- ✓ Espátulas y microespátulas
- ✓ Soporte universal
- ✓ Telas de alambre con asbesto
- ✓ Anillo metálico

\* MATERIAL ESTÉRIL

## MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- ✓ Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

## EQUIPO

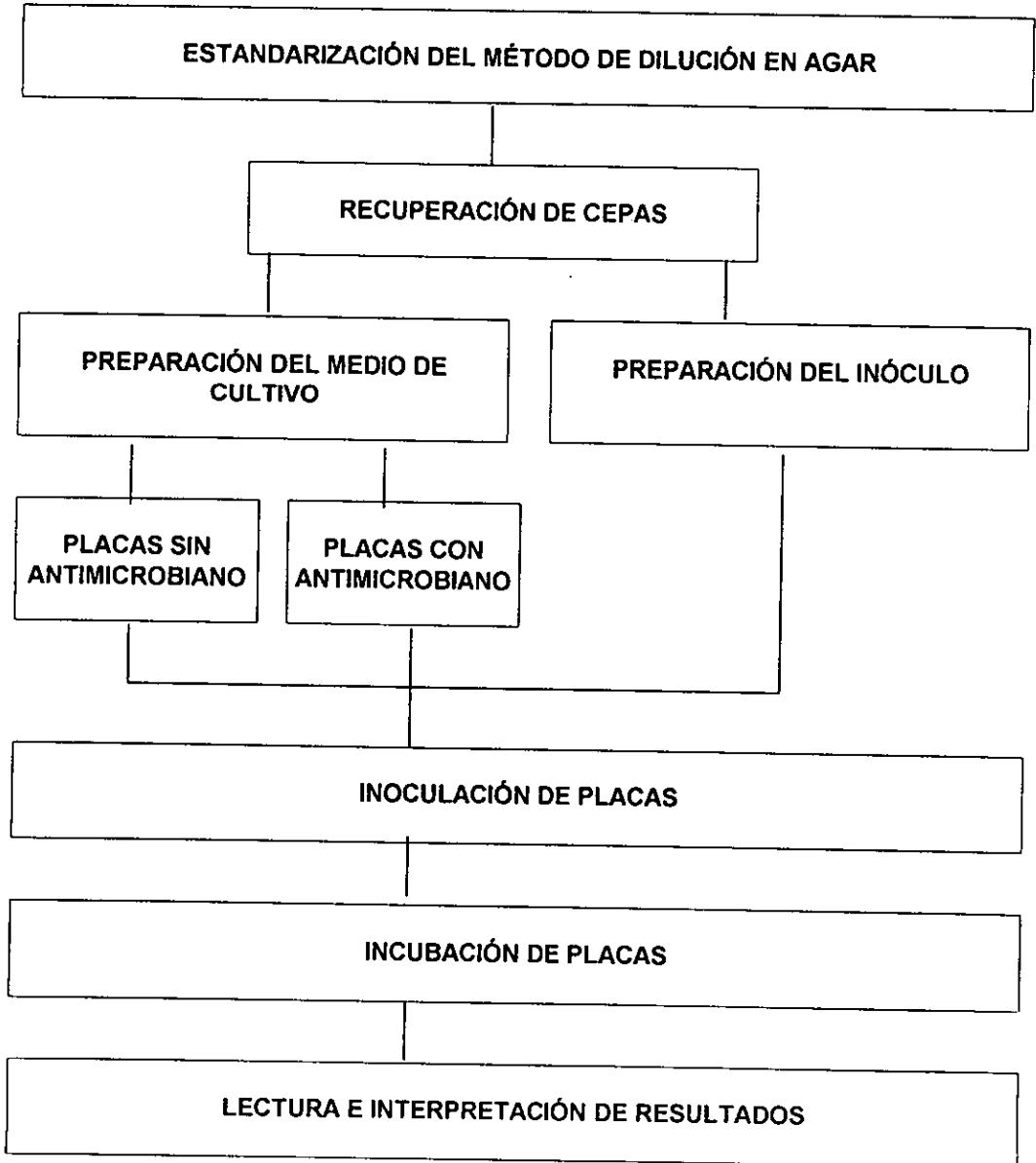
- ✓ Incubadora (VIP CO2 Incubator)
- ✓ Lámpara de luz blanca (Quinzañoticino)
- ✓ Olla de presión (Presto Mod. 21 L)
- ✓ Vórtex 2-Genie
- ✓ Replicador de Steers (Craft machine Inc.)
- ✓ Baño de agua (Fisher Scientific)

## INSTRUMENTOS

- ✓ Balanza analítica (Mettler H31)
- ✓ Balanza granataria (Equipar)
- ✓ Potenciómetro (pH meter Model 810)
- ✓ Micropipeta 10-200  $\mu$ L



## DIAGRAMA DE FLUJO



## VIII. MÉTODOS

### RECUPERACIÓN DE CEPAS

1. Se separaron los criotubos con las cepas seleccionadas del cepario 4-A (-20°C) del laboratorio de brucelosis del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
2. Se dejaron en reposo hasta que tomaron la temperatura ambiente.
3. Se inocularon las placas de agar brucela con 80  $\mu$ L del contenido de cada criotubo el cual fue cuidadosamente agitado con anterioridad.
4. Se permitió la absorción del inóculo durante 15 minutos.
5. Se aisló por estría cruzada.
6. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas en la incubadora VIP.
7. Se revisó el crecimiento de las placas.
8. Se separaron las placas con crecimiento cuya morfología colonial fue característica del género *Brucella* y la prueba de aglutinación con suero polivalente anti-*Brucella* fue positiva. Estas cepas se mantuvieron en refrigeración hasta antes de su utilización.
9. Las cepas que no presentaron desarrollo se dejaron en incubación 24 horas más, las cepas que crecieron se trataron como en el punto anterior, las que no crecieron se desecharon y se sembraron nuevos criotubos obtenidos del cepario 4-A(-70°C).

### AGENTES ANTIMICROBIANOS

1. Los agentes antimicrobianos se obtuvieron comercialmente de la marca SIGMA. Guardándose en refrigeración dentro de un desecador.
2. Cada vez que se requirieron se sacó el desecador del refrigerador y se permitió que tomara la temperatura ambiente antes de sacar los frascos de agente antimicrobiano evitando así la formación de agua de condensación.

## PESADA DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

La siguiente fórmula se empleó para calcular la cantidad de polvo o diluyente necesarios para preparar la solución stock de cada antimicrobiano.

$$\text{Masa (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg)}}$$

## PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES STOCK

Las soluciones stock se prepararon a una concentración de 1280  $\mu\text{g/mL}$ , los solventes y diluyentes empleados para cada agente se muestran en la tabla 4. Estas soluciones se esterilizaron por filtración empleando filtros millipore de 0.22  $\mu\text{m}$

**TABLA 4**

### SOLVENTES Y DILUYENTES PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

ANTIBIOTICO	POTENCIA ( $\mu\text{g/mg}$ )*	SOLVENTE	DILUYENTE
Rifampicina	975	Dimetilsulfóxido	Regulador de fosfatos pH 7 0.1 M
Estreptomicina	750	Agua	Agua
Penicilina G	1014	Agua	Agua
Tetraciclina	980	NaOH 1 N	Agua
Eritromicina	955	Etanol	Agua
Doxiciclina	902	Agua	Agua
Sulfametoxazol	990	Acetona	Agua
Trimetoprim	990	HCl 0.05N 10% del volumen final	Agua (requiere calor)

\*Valor proporcionado por el distribuidor.

## PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL ANTIMICROBIANO

Se realizaron diluciones dobles de cada antimicrobiano de acuerdo con la tabla 5.

TABLA 5

### SISTEMA DE PREPARACIÓN DE DILUCIONES PARA EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

SOLUCIÓN ANTIMICROBIANA				Concentración final a 1:10 en las placas de agar ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Volumen (mL)	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Solvente estéril (mL)	Concentración intermedia ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
4.0	1280	0.0	1280	128
2.0	1280	2.0	640	64
1.0	1280	3.0	320	32
1.0	1280	7.0	160	16
2.0	160	2.0	80	8
1.0	160	3.0	40	4
1.0	160	7.0	20	2
2.0	20	2.0	10	1
1.0	20	3.0	5	0.5
1.0	20	7.0	2.5	0.25

FUENTE: 45

## PREPARACIÓN DEL AGAR ISO-SENSITEST

1. Se pesaron 75.0 g de medio caldo Iso-sensitest y 48.0 g de agar bacteriológico.
2. Lo anterior se disolvió en 2880 mL de agua destilada y se fundió.
3. Una vez fundido se tomó una muestra del medio y se le midió el pH su valor debió ser de 7.2 a 7.4, cuando el valor de pH fue diferente se ajustó agregando hidróxido de sodio 1 M o ácido clorhídrico 1 M
4. Se agregaron 36 mL del medio fundido en botellas de leche.
5. Éstas se esterilizaron en autoclave a 20 libras de presión durante 15 minutos.
6. Una vez concluida la esterilización las botellas se colocaron en baño maría a 48°C para su posterior utilización.

## PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE AGAR CON ANTIMICROBIANO

1. Las placas se prepararon 24 horas antes de realizar la inoculación de cepas.
2. Cada solución de antimicrobiano se agregó en una botella de leche mantenida a 48°C y se agitó cuidadosamente hasta obtener una solución homogénea.
3. Inmediatamente después se vació el contenido en dos cajas de Petri previamente rotuladas.
4. Las cajas se colocaron antes de la solidificación del medio en una superficie plana y horizontal (estas zonas se ubicaron empleando un nivel).
5. Una vez solidificado el medio las placas se colocaron en bolsas de polietileno previamente etiquetadas y se guardaron en refrigeración.

## PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE AGAR TESTIGO

1. Se pesaron 3.7 g de medio caldo Iso-sensitest y 2.4 g de agar bacteriológico.
2. Lo anterior se disolvió en un matraz Erlenmeyer con 160 mL de agua destilada y se fundió.
3. Una vez fundido se tomó una muestra del medio y se le midió el pH su valor debió ser de 7.2 a 7.4, cuando el valor de pH fue diferente se ajustó agregando hidróxido de sodio 1 M o ácido clorhídrico 1 M.
4. Se esterilizó en autoclave a 20 libras de presión durante 15 minutos.
5. Una vez concluida la esterilización el matraz se colocó en baño maría a 48°C.
6. El medio se vació en ocho cajas de Petri y éstas se colocaron en una superficie plana y horizontal antes de que el medio se solidificara.
7. Una vez solidificado el medio las placas se colocaron en bolsas de polietileno previamente etiquetadas y se guardaron en refrigeración.

## PREPARACIÓN DEL INÓCULO

1. Las cepas que se recuperaron se resembraron en placas de agar brucela y se incubaron a 37°C durante 48 horas.
2. Después del periodo de incubación se revisó la morfología colonial de las cepas y se les realizó la prueba de aglutinación con suero polivalente anti-*Brucella*.
3. De cada cepa se preparó una suspensión con turbidez comparable a la del tubo 0.5 del nefelómetro de MacFarland tomando con asa bacteriológica 4 o 5 colonias representativas de cada cepa transfiriéndolas a un tubo de ensayo con 3 mL de solución salina isotónica estéril (SSIE) y agregando paulatinamente con una jeringa estéril SSIE según como fuera necesario al comparar la turbidez de la suspensión con el estándar utilizando como fondo una línea negra sobre una superficie blanca.
4. De cada suspensión bacteriana se realizó por duplicado una dilución 1:20 agregando 100 µL de la suspensión inicial en 1.9 mL de SSIE siendo éstas las suspensiones de trabajo.

## INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

1. A cada pozo de la placa contenedora de inóculos del replicador de Steers (juego uno) se le colocó 0.5 mL de la suspensión de trabajo. Cada placa tiene 32 pozos, de los cuales, 29 se emplearon para contener cepas de *Brucella* y los 3 restantes para las tres cepas de referencia.
2. Se llevó a cabo la inoculación de placas con antimicrobiano comenzando con la placa de menor concentración y finalizando con la placa testigo (para verificar la viabilidad de las cepas). Con la carga del juego uno se inocularon las placas de cuatro antimicrobianos (rifampicina, doxiciclina, tetraciclina y estreptomycin).
3. Se llenaron los pozos del juego dos como ya se indicó y se procedió a inocular las placas de los cuatro antimicrobianos restantes (trimetoprim, sulfametoxazol, penicilina G y eritromicina).
4. Se permitió la absorción de los inóculos durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas.

## DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS FINALES

Transcurridas las 72 horas de incubación se llevó a cabo la lectura de placas, tomándose como crecimiento la presencia de más de tres colonias características del género *Brucella*. Se consideró la concentración inhibitoria mínima (MIC) como la mínima concentración del antimicrobiano que inhibió el crecimiento del microorganismo.

## CONTROL DE CALIDAD

El propósito del control de calidad fue asegurar la correcta elaboración de los reactivos así como el trabajo individual de quienes realizamos el método y la lectura de los resultados.

### CEPAS DE REFERENCIA

Las cepas de referencia utilizadas fueron: *S.aureus* ATCC 29213, *E.coli* ATCC25922 y *Ps.aeruginosa* ATCC27853 según lo recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (45).

### ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

- Método a corto plazo
  1. Se inocularon dos tubos inclinados de agar soya tripticasa por cada cepa los cuales fueron perfectamente identificados.
  2. Se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas.
  3. Se cubrió el tapón con papel parafilm y se guardaron en refrigeración.
  
- Método a mediano plazo
  1. Cada cepa fue sembrada por estría cruzada en placa de agar soya tripticasa y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas.
  2. Se preparó por cada cepa una suspensión bacteriana con turbidez comparable a la del tubo 4 del nefelómetro de MacFarland.
  3. Se inocularon masivamente con 0.5 mL de suspensión bacteriana dos botellas de leche con agar soya tripticasa por cada cepa y se incubaron a 37°C durante 24 horas.
  4. Se cosecharon las cepas usando 5.0 mL de leche glicerizada por cada botella y la suspensión final se dosificó en cuatro criotubos por cepa perfectamente identificados.
  5. Los criotubos se guardaron en refrigeración durante 24 horas, posteriormente se pasaron a guardar a -20°C y finalmente se guardaron a -70°C.

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

1. Cada cepa se sembró 24 horas antes de la inoculación de las placas con antimicrobiano.
2. Las cepas se sembraron en placas de agar soya tripticasa por estría cruzada y se incubaron a 37°C. Se revisó la morfología colonial de cada cepa y se preparó la suspensión bacteriana de cada una de ellas como se indicó en los pasos 3 y 4 del método "Preparación del inóculo".

## FRECUENCIA DEL CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de medio con antimicrobiano preparado se verificó con las tres cepas de referencia.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD

Transcurrido el periodo de incubación se llevó a cabo la lectura de placas, tomándose como crecimiento la presencia de más de tres colonias características del género. Se consideró la concentración inhibitoria mínima (MIC) como la mínima concentración del antimicrobiano que inhibió el crecimiento del microorganismo.

Los rangos de MIC aceptables se muestran en la tabla 6. Cuando el valor de MIC no fue el ideal se repitió todo el proceso.

**TABLA 6**

### RANGOS DE MIC'S ( $\mu\text{g/mL}$ ) ACEPTABLES PARA EL CONTROL DE CALIDAD

ANTIMICROBIANO	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
ESTREPTOMICINA	-	-	-
ERITROMICINA	0.12-0.50	-	-
PENICILINA G	0.25-1.0	-	-
RIFAMPICINA	0.25-1.0	8.0-32.0	32.0-64.0
TETRACICLINA	0.25-1.0	1.0-4.0	8.0-32.0
SULFISOXAZOLE*	32.0-128.0	8.0-32.0	-
TRIMETOPRIM*	1.0-4.0	0.5-2.0	>64.0

\*Medio suplementado con sangre de caballo desfibrinada.

FUENTE: Modificado de 41 y 45.

## DISEÑO ESTADÍSTICO

Análisis de frecuencia.



## IX. RESULTADOS

TABLA R1

**MIC'S ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DE CEPAS DE ORIGEN HUMANO  
(N=84)**

ANTIMICROBIANO	CONC. EN SANGRE	MIC 50	MIC 90	RANGO	RESISTENCIA (%)
RIFAMPICINA	6.0	2.0	4.0	0.5->128.0	2.4 (N=2)
DOXICICLINA	3.0	1.0	2.0	$\leq 0.25$ -4.0	8.3 (N=7)
TETRACICLINA	3.5	1.0	2.0	0.4-4.0	10.7 (N=9)
ESTREPTOMICINA	40.0	2.0	2.0	1.0->128.0	6.0 (N=5)
TRIMETOPRIM	2.5	32.0	32.0	32.0	-
SULFAMETOXAZOL	50.0	>128.0	>128.0	>128.0	-
PENICILINA G	1.2	1.0	16.0	0.5-64.0	39.3 (N=33)
ERITROMICINA	1.4	4.0	8.0	0.5-32.0	87.0 (N=73)

Los valores están expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . MIC50: Concentración mínima de antimicrobiano que inhibió el crecimiento del 50% de cepas. MIC90: Concentración mínima de antimicrobiano que inhibió el 90% de las cepas. N: Cantidad de cepas incluidas en el estudio. Resistencia %(N): Número de cepas resistentes.

TABLA R2

**MIC'S ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DE CEPAS DE ORIGEN ANIMAL  
(N=19)**

ANTIMICROBIANO	CONC. EN SANGRE	MIC 50	MIC 90	RANGO	RESISTENCIA (%)
RIFAMPICINA	6.0	4.0	8.0	2.0-8.0	15.8 (N=3)
DOXICICLINA	3.0	2.0	4.0	1.0-4.0	15.8 (N=3)
TETRACICLINA	3.5	1.0	4.0	0.5-4.0	15.8 (N=3)
ESTREPTOMICINA	40.0	2.0	4.0	2.0->128.0	15.8 (N=3)
TRIMETOPRIM	2.5	32.0	32.0	32.0	-
SULFAMETOXAZOL	50.0	>128.0	>128.0	>128.0	-
PENICILINA G	1.2	16.0	32.0	0.5-32.0	79.0 (N=15)
ERITROMICINA	1.4	4.0	16.0	1.0-32.0	95.0 (N=18)

Los valores están expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . MIC50: Concentración mínima de antimicrobiano que inhibió el crecimiento del 50% de cepas. MIC90: Concentración mínima de antimicrobiano que inhibió el 90% de las cepas. N: Cantidad de cepas incluidas en el estudio. Resistencia %(N): Número de cepas resistentes.

TABLA R3

**MIC'S ( $\mu\text{g/mL}$ ) DE LOS BIOTIPOS DE LAS CEPAS DE ORIGEN HUMANO**

ANTIBIÓTICO	<i>B.melitensis</i> 1 (N=73)	<i>B.melitensis</i> 2 (N=4)	<i>B.melitensis</i> 3 (N=7)
RIFAMPICINA	1.0->128.0	0.5-4.0	2.0-4.0
DOXICICLINA	0.5-4.0	<0.25-4.0	1.0-4.0
TETRACICLINA	0.5-4.0	0.5-4.0	1.0-4.0
ESTREPTOMICINA	1.0->128.0	1.0-2.0	2.0
TRIMETOPRIM	32.0	32.0	32.0
SULFAMETOXAZOL	>128.0	>128.0	>128.0
PENICILINA G	0.5-32.0	0.5-1.0	1.0-32.0
ERITROMICINA	0.5-16.0	0.5-8.0	1.0-32.0

TABLA R4

**RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD**

ANTIMICROBIANO	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>Ps.aeruginosa</i> ATCC 27853
ESTREPTOMICINA	4.0	4.0-8.0	32.0-64.0
ERITROMICINA	<0.25-0.25	32.0	32.0
PENICILINA G	0.25	64.0	>128.0
RIFAMPICINA	0.25	8.0-16.0	32.0
TETRACICLINA	0.25-1.0	1.0-4.0	32.0
SULFAMETOXAZOL	32.0-64.0	16.0-32.0	>128.0
TRIMETOPRIM	1.0-2.0	0.5-2.0	>128.0

## X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Históricamente, en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* con *Brucella* se han empleado una gran variedad de medios de cultivo, concentraciones de inóculo, periodos de incubación y condiciones de atmósfera (31-37). En este estudio se usó el método recomendado por el NCCLS (45) con algunas modificaciones que se establecieron una vez que se hicieron pruebas piloto empleando 15 cepas de *Brucella* spp y las cepas de referencia *S.aureus* ATCC 29213, *E.coli* ATCC 25922, *Ps.aeruginosa* ATCC 27853: el caldo soya tripticasa se sustituyó por solución salina isotónica estéril para mantener la concentración de inóculo constante ya que al no haber nutrientes en el medio las bacterias no tienen la materia prima para sus funciones metabólicas y por consiguiente no hay multiplicación bacteriana; el periodo de incubación fue de 72 horas en lugar de 24 h debido a que los microorganismos del género *Brucella* son de crecimiento lento; las placas se incubaron en atmósfera húmeda para evitar la deshidratación de las mismas como consecuencia del periodo de incubación prolongado; el agar Mueller-Hinton se sustituyó por caldo Iso-sensitest con 1.5% de agar bacteriológico.

Analizando los valores de las tablas R1 y R2 se observa que las cepas de origen animal son menos susceptibles a los antimicrobianos de prueba que las cepas de origen humano lo cual es indicativo de que el supuesto bajo el cual se planteó la hipótesis no es del todo cierto y muy probablemente el ser humano administra agentes antimicrobianos a los animales lo que constituye el estímulo para que tenga lugar la selección de cepas resistentes.

Es conveniente mencionar que en los resultados obtenidos existe un sesgo debido a que el tamaño de muestra de las cepas de origen animal es pequeño (19 cepas) y menor que el tamaño de muestra de cepas de origen humano (84 cepas), no obstante, se analizará la información obtenida no sin antes recomendar que se intensifique la búsqueda del microorganismo en los animales o en sus productos para fines de investigación. Las cepas de origen animal incluidas en el estudio son todas con las que cuenta el cepario del laboratorio de brucelosis del INDRE.

Apegándonos a las definiciones de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana se encontró que algunas cepas presentan resistencia a los antimicrobianos de prueba; se observó que la proporción de cepas de origen humano resistentes a los antimicrobianos indicados en la NOM 022-SSA2-1994 es menor (rifampicina, 2.4%; doxiciclina, 8.3%; tetraciclina, 10.7% y estreptomomicina 6.0%) que las cepas de origen humano resistentes a la penicilina G (39.3%) y eritromicina (87.0%). Las cepas de origen animal se comportaron de manera similar (rifampicina, doxiciclina, tetraciclina y estreptomomicina: 15.8%; penicilina G, 79.0% y eritromicina, 95%); esto nos conduce a pensar que existe un problema bastante serio ya que antes se creía que las recaídas de la enfermedad sólo se

debían a que el esquema del tratamiento no se seguía correctamente, lo que ocasionaba que quedaran focos de infección que con el transcurso del tiempo se manifestaban nuevamente como enfermedad propiamente dicha. Con base en los resultados obtenidos en este estudio nos permite inferir que la falla del tratamiento se debe muy probablemente a que la cepa infectante es desde un principio resistente.

Analizando los resultados obtenidos con el trimetoprim y el sulfametoxazol, éstos sugieren que el 100% de las cepas incluidas en el estudio son resistentes a ambos lo que se considera no real ya que se debe considerar que la actividad de estos agentes antimicrobianos es sinérgica y se debieron probar en forma combinada.

Al comparar los resultados obtenidos en el estudio realizado con los reportados en la literatura sólo se consideraron los reportes más recientes. Los resultados obtenidos con la rifampicina, en Israel emplearon el método de dilución en agar (ADil.) y 86 cepas (tamaño de muestra y método semejantes a nuestro estudio), los valores de MIC 50 y MIC 90 (2.5 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) fueron similares a los obtenidos en este estudio (2.0 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$ ) aunque en Israel no reportan cepas resistentes a este antimicrobiano. En cuanto a los otros estudios se puede observar que hay diferencias pero se debe considerar que el tamaño de muestra en éstos es menor lo que origina que el estudio no sea del todo representativo.

Los resultados obtenidos con tetraciclina, penicilina G y eritromicina en nuestro estudio (Tablas D2, D4 y D5) muestran que las cepas aisladas en la República Mexicana son menos susceptibles que aquellas aisladas en el extranjero lo que podría constituir una diferencia entre las cepas de México y de otros países.

Con respecto a lo que se obtuvo con estreptomina en nuestro estudio (Tabla D3) se observó que las diferencias son tolerables pero sólo se observó resistencia en las cepas de México.

Los resultados del control de calidad del estudio se muestran en la tabla R4, los valores de MIC registrados se encontraron dentro de los rangos reportados en la literatura. Cuando no se encontraron valores reportados (por ejemplo, para la estreptomina) se consideró correcto el que el valor de MIC obtenido permaneciera constante a lo largo del proceso.

**TABLA D1**  
**RIFAMPICINA**  
**COMPARACIÓN DE MIC'S ( $\mu\text{g/mL}$ ) CON ESTUDIOS DEL EXTRANJERO**

AÑO/PAIS	MIC 50	MIC 90	RANGO	METODO	N=	FUENTE
1997 MEXICO	2.0	4.0	0.5->128.0	ADil.	84	ESTUDIO
1993 -	0.5	1.0	0.1-4.0	ADil.	62	36
1991 ISRAEL	2.5	4.0	-	ADil.	86	37
1989 A. SAUDITA	0.15	1.25	0.02-2.5	BDil.	47	35
1986 USA	0.25	1.0	0.06-1.0	BMic.	15	32
1984 -	-	-	0.25-2.0	ADil.	31	31

**TABLA D2**  
**TETRACICLINA**  
**COMPARACIÓN DE MIC'S ( $\mu\text{g/mL}$ ) CON ESTUDIOS DEL EXTRANJERO**

AÑO/PAIS	MIC 50	MIC 90	RANGO	MÉTODO	N=	FUENTE
1997 MEXICO	1.0	2.0	0.5-4.0	ADil.	84	ESTUDIO
1993 -	0.2	0.2	0.01-0.2	ADil.	62	36
1989 A.SAUDITA	0.005	0.04	0.001-0.6	BDil.	47	35
1986 USA	$\leq 0.13$	0.25	$\leq 0.13$ - 0.25	BMic.	15	32

TABLA D3

## ESTREPTOMICINA

COMPARACIÓN DE MIC'S ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) CON ESTUDIOS DEL EXTRANJERO

AÑO/PAIS	MIC50	MIC 90	RANGO	METODO	N=	FUENTE
1997 MÉXICO	2.0	2.0	1.0- >128.0	ADil.	84	ESTUDIO
1993 -	2.0	4.0	0.1-4.0	ADil.	62	36
1991 ISRAEL	1.25	3.1	-	ADil.	86	37
1989 A.SAUDITA	0.6	2.5	0.15-5.0	BDil.	47	32
1986 USA	2.0	4.0	1.0-4.0	BMic.	15	31

TABLA D4

## PENICILINA G

COMPARACIÓN DE MIC'S ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) CON ESTUDIOS DEL EXTRANJERO

AÑO/PAIS	MIC 50	MIC 90	RANGO	MÉTODO	N=	FUENTE
1997 MÉXICO	1.0	16.0	0.5-64.0	ADil.	84	ESTUDIO
1986 USA	1.0	4.0	0.25-8.0	BMic.	15	32

Los valores están expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . MIC50: Concentración mínima de antimicrobiano que inhibió el crecimiento del 50% de cepas.  
MIC90: Concentración mínima de antimicrobiano que inhibió el 90% de las cepas. N: Cantidad de cepas incluidas en el estudio.

**TABLA D5**  
**ERITROMICINA**  
**COMPARACIÓN DE MIC'S ( $\mu\text{g/mL}$ ) CON ESTUDIOS DEL EXTRANJERO**

AÑO/PAIS	MIC 50	MIC 90	RANGO	MÉTODO	N=	FUENTE
1997 MÉXICO	4.0	8.0	0.5-32.0	Adil.	84	ESTUDIO
1993 -	4.0	16.0	0.2-16.0	Adil.	62	36
1986 USA	8.0	>8.0	0.5->8.0	Bmic.	15	32

Adil.	Dilución en agar
Bdil.	Dilución en caldo
Bmic.	Microdilución en caldo
N	Número de cepas

## XI. CONCLUSIONES

- ✓ El método empleado en el estudio se estandarizó al efectuar pruebas piloto con 15 cepas de *Brucella* spp y las cepas de referencia *S.aureus* ATCC 29213, *E.coli* ATCC 25922, *Ps.aeruginosa* ATCC 27853.
- ✓ Las cepas de origen animal fueron menos susceptibles que las cepas de origen humano.
- ✓ Las cepas aisladas en la República Mexicana son menos susceptibles que las cepas aisladas en el extranjero.
- ✓ En el estudio se encontraron cepas resistentes a los antimicrobianos indicados en la NOM 022-SSA2-1994 así como a eritromicina y penicilina G (tablas R1 y R2).
- ✓ Los hallazgos obtenidos indican el escaso control que se tiene en México en cuanto a la administración de antimicrobianos en humanos y en animales lo que trae como consecuencia que cada vez sea más difícil el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



## XII. RECOMENDACIONES

- ✓ Implementar estudios encaminados a mantener una vigilancia permanente de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Brucella* spp aisladas en la República Mexicana.
  
- ✓ Intensificar la búsqueda del microorganismo en los animales y/o sus productos para que en posteriores investigaciones los resultados sean más representativos.
  
- ✓ Para la determinación de la susceptibilidad de las cepas con trimetoprim y sulfametoxazol es indispensable que se prueben en forma combinada ya que su actividad es sinérgica.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández I, Peña GP, Betancourt X. Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR: Brucelosis. México: INDRE, 1996:18-51.
2. Matyas Z, Fujikura T. Brucellosis as a world problem. *Develop Biol Standard* 1984;56:3-20.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: I.N.R.A., 1988:17-129.
4. Perea EJ. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. España: Ediciones Doyma, 1992; vol.1:199-206.
5. Ollé GJ, Canella SJ. An outbreak of *Brucella melitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers. *Am J Public Health* 1987;77:335-338.
6. Miller CD, Songer JR, Sullivan JF. An twenty-five year review of laboratory-acquired human infections at the National Disease Center. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987;48:271-275.
7. Mousa AR, Elhag KM, Khogali M, Marafie AA. The nature of human brucellosis in Kuwait: study of 379 cases. *Ref Infect Dis* 1988;10:211-217.
8. Gruner E, Bernasconi E, Galeazzi RL, Buhl D, Heinzle R, Nadal D. Brucellosis: an occupational hazard for medical laboratory personnel. Report of five cases. *Infection* 1994;22:34-36.
9. Scott J, Arlett PR, Hughes JMB and col. An case of laboratory acquired brucellosis. *BMJ* 1996; 313:1130-1132.
10. Zervos MJ, Bostic G. Exposure to *Brucella* in the laboratory. *Lancet* 1997;349:651.
11. Luzzi GA, Brindle R, Sockett PN, Solera J, Klenerman P, Warell DA. Brucellosis: imported and laboratory-acquired cases, and an overview of treatment trials. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;87:138-141.
12. Kumate J, Gutiérrez G. *Manual de infectología*. 11ª ed. México: Francisco Méndez Cervántez, 1987:68-76.
13. Hernández D. Brucelosis. Presentación clínica y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 1996;16:268-270.
14. Romero P. *Microbiología y parasitología humana*. México. Edit. Médica Panamericana, 1993:41-51.
15. Higuera F, Anguiano V. Brucelosis. *Infectología* 1981;2:163-168.
16. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre en el primer nivel de atención. *Diario Oficial de la Federación*. 30 de noviembre de 1995,2-11.
17. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Boletín de Epidemiología*, diciembre de 1989 a enero de 1998.
18. Kagan BM. *Terapéutica antimicrobiana*. Barcelona: Salvat Editores, 1978:3-11.
19. Pumarola A, Rodríguez TA, García RJ, Piedrola AG. *Microbiología y parasitología médica*. 2ª ed. Barcelona: Ediciones científicas Técnicas S.A., 1987:120-152.
20. Brater Dc, Johnson AR. *Farmacología médica*. 13ª ed. México: Edit. Médica Panamericana S.A., 1993:628-636.

21. Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. Microbiología médica. España: Mosby Year Book, 1992:34-46.
22. Katsun BG. Farmacología básica clínica. 4ª ed. El Manual Moderno, 1991:550-597.
23. Joklik WK, Willet HP, Amos DB. Microbiología. 18ª ed. Argentina: Panamericana, 1986:273-279.
24. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, Jawetz E, Meinick JL, Adelberg EA. Microbiología médica. 14ª ed. El Manual Moderno, 1992:162-164.
25. Brock TD, Madigan MT. Microbiología. 6ª ed. México: Prentice Hall Hispanoamericana, 1993:262,263,266-272,277-282.
26. Gardner EJ. Principios de genética. 5ª ed. México: Limusa, 1979:238-255.
27. Tortora GJ, Funke B, Case CZ. Microbiology: an introduction. 5<sup>th</sup> ed. California: The Benjamin/Cumming: Publishing Company Inc. 1995:212-218.
28. Davies J. Another look at antibiotic resistance. J General Microbiol 1992;138:1553-1559.
29. Litter M. Farmacología experimental y clínica. 7ª ed. Argentina: El Ateneo, 1988:1444-1580.
30. Clark WG, Brater DC, Johnson AR. Farmacología médica. 13ª ed. España: Mosby, 1993:628-636.
31. Hall WH. Modern chemotherapy for brucellosis in human. Rev Infect Dis 1990;12:1060-1099.
32. Mortensen JE, Moore DG, Clarridge JE, Young EJ. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Brucella*. Diagn Microbial Infect Dis 1986;5:163-169.
33. Robertson L, Farrell JD, Hinchliffe PM. The sensibility of *Brucella* to chemotherapeutiics agents. J Med Microbiol 1973;6:549-557.
34. Palenque E, Otero JL, Noriega AR. *In vitro* susceptibility of *Brucella melitensis* to new cephalosporins crossing the blood-barrier. Antimicrob Agents Chemother 1986;29:182-183.
35. Yousuf M, Dizon N, kiel FW. Comparative *in vitro* activities of ofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin, and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:1409-1410.
36. García JA, Muñoz JL, Fresnadillo MJ, Trujillano J. *In vitro* activities of new macrolides and rifapentina against *Brucella* spp. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:911-913.
37. Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamansteis L, Joseph G, Anderson M, Harrison K. *In vitro* susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1925-1927.
38. Lennette EH. Manual de microbiología. 4ª ed. Bogotá: Edit. Médica Panamericana, 1987:1191-1265.
39. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HB, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. 3ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1992:564-620.
40. Hawkey PM, Lewis DA. Medical bacteriology. Oxford: Information Press Ltd, 1989:167-194.
41. Nino HV, Barrera LA. Garantía de calidad en el laboratorio clínico. Bogotá: Edit. Panamericana, 1993:363-394.
42. Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot and Chemother 1959;9:307-311.

43. Barry AL. The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Philadelphia: Lea &Febiger, 1976:8-10.
44. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 4<sup>th</sup> ed. Publication M2-T4, villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1988:75-93.
45. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 2<sup>th</sup> ed.; Tentative Standard NCCLS; 1988:95-177.
46. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. Diagnostic microbiology. 8<sup>a</sup> ed. USA: The C.V. Mosby Company, 1990:171-194.
47. Kloge RM. Accuracy of Kirby-Bauer susceptibility test read at 4, 8 and 12 hours of incubation: comparison with readings at 18 to 20 hours.
48. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion test. J Clin Microbiol 1984;20:473-477.
49. Farreras P. Medicina Interna. 12<sup>a</sup> ed. España: Ediciones Doyma, 1988:2507-2511.
50. Álvarez A, Cruz M, Mora R, Solano L, Frias A. Brucellosis. Experiencia durante los últimos años en el Hospital Central Militar. Rev Sanid Milit 1994;48:113-115.