



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**MULTIRESISTENCIA BACTERIANA A
ANTIBIÓTICOS EN PIEL DE NIÑO SANO
EN EDAD PREESCOLAR**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ELAY MIJAIL RENTERIA FALOMIR



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



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 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

SECRETARIO: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

1er. SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

2° SUPLENTE: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz _____

SUSTENTANTE:

Elay Mijail Renteria Falomir _____

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. GENERALIDADES	4
2.1 PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS	6
2.2 PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	7
2.3 ANTIBIÓTICOS	8
2.3.1. CLASIFICACIÓN CON BASE A SU EFECTO QUE EJERCEN SOBRE LA BACTERIA	8
2.3.2 CLASIFICACIÓN CON BASE A SU MECANISMO DE ACCIÓN	9
2.3.3 AMPICILINA	12
2.3.4 DICLOXCILINA	13
2.3.5 CEFOTAXIMA	14
2.3.6 CEFTRIAXONA	15
2.4 INTERACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	16

2.5 CRITERIOS PARA LA UTILIZACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	18
2.6 RECOMENDACIONES PARA EL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS	20
2.7 ANTIBIOGRAMAS	21
2.8 DAÑOS AL AMBIENTE POR USO DE ANTIBIÓTICOS	22
2.9 RESISTENCIA BACTERIANA	24
2.9.1 RESISTENCIA NATURAL	25
2.9.2 RESISTENCIA ADQUIRIDA	25
2.9.3 RESISTENCIA RELATIVA O INTERMEDIA	26
2.9.4 RESISTENCIA ABSOUTA	26
2.9.5 PSEUDORESISTENCIA	27
2.10 ELEMENTOS MÓVILES DE RESISTENCIA ADQUIRIDA	27
2.11 MECANISMOS DE RESISTENCIA	29

2.11.1 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA	29
2.11.2 MODIFICACIÓN O INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO	31
2.11.3 ALTERACIONES DEL SITIO DONDE LOS ANTIBIÓTICOS EJERCEN SU ACCIÓN	35
2.11.4 BOMBAS DE EXPULSIÓN	36
2.11.4.1 BOMBAS DE EXPULSIÓN PERTENECIENTES A LA SUPERFAMILIA MFS	40
2.11.4.2 BOMBAS DE EXPULSIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA MATE	41
2.11.4.3 BOMBAS DE EXPULSIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA RND	42
2.12 UN PERFIL DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA DE LA PIEL HUMANA	46
3. OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GENERAL	48
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	48
4. HIPÓTESIS	48

5. DIAGRAMA DE FLUJO	49
5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	50
5.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	50
5.3 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	50
5.3.1 SIEMBRA EN MEDIO MSA Y McCONKEY	53
5.3.2 ANTIBIOGRAMA	53
5.3.3 REPLICA PLATING	54
5.3.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	56
5.3.5 BROMURO DE ETIDIO	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1 CUESTIONARIO	58
6.2 RESISTENCIA BACTERIANA A CUATRO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS	64

6.3 PORCENTAJE DE RESISTENCIA BACTERIANA POR ZONAS DE LAS MUESTRAS TOTALES	66
6.4 GRÁFICAS DE PORCENTAJE DE RESISTENCIA BACTERIANA POR ZONAS	67
6.5 ZONAS CON MAYOR PRESENCIA DE RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS PROBADOS	70
6.6 ANTIBIOGRAMA	70
6.7 REPLICA PLATING	71
6.8 ESTUDIOS CON BROMURO DE ETIDIO	75
7. CONCLUSIONES	77
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9. APÉNDICE	83

1. RESUMEN

El empleo de agentes farmacológicos en el tratamiento de infecciones comienza cuando los chinos hace más de 2 500 años, utilizaron la cáscara enmohecida de la soya en el tratamiento de carbuncos, forúnculos e infecciones similares. Con el avance de la ciencia en el año 1877 Pasteur y Joubert reconocen las potencialidades clínicas de los microorganismos como agentes terapéuticos. Los estudios de Ehrlich llevaron a formular los principios de la toxicidad selectiva y en reconocer las relaciones químicas específicas entre los parásitos y los medicamentos, el desarrollo de resistencia a medicamentos en los parásitos y el papel que jugaba la terapéutica combinada para combatir dicha resistencia. (Cordies Jackson, 1998)

La era moderna de la terapéutica antimicrobiana se inicia en 1934 con la descripción de Dogmak de la efectividad de la primera sulfonamida en el tratamiento de las infecciones experimentales por estreptococos. La llamada "Edad de Oro" de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos. (Machado Reyes 1998)

En la actualidad se calcula que aproximadamente el 40% de todos los pacientes hospitalizados reciben tratamiento con antimicrobianos, por lo que en las últimas décadas se han obtenido numerosos compuestos de esta índole, los que resultan de utilidad incuestionable. Sin embargo, su amplio uso fomenta el aumento de la resistencia de las bacterias, lo que crea una necesidad cada vez mayor de nuevos fármacos. (Machado Reyes 1998)

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades infecciosas ha constituido un acontecimiento sin precedentes, por lo que la curación y el control de las infecciones han permitido modificar favorablemente el panorama, tanto de la morbilidad, así como la mortalidad en los seres humanos. (Cordies Jackson, 1998)

El desarrollo de la terapia con antibióticos permitía un eficaz tratamiento de las infecciones bacterianas agudas y algunas enfermedades crónicas, pues los antibióticos resultaban ser alentadores para el control de las enfermedades bacterianas, infecciones parasitarias y micóticas. El desarrollo alcanzado por la microbiología en nuestros días, ha permitido identificar otros tipos de microorganismos e infecciones, por lo que se hace necesario el uso de nuevos fármacos para su tratamiento, ya que se ha reportado en la literatura la multiresistencia a antibióticos de mayor uso. (Machado Reyes, 1998)

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico. (Sussmann P, 2001)

Los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos desde el principio de la era antibiótica. Un ejemplo de esto es la importancia inicial de cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de degradar la penicilina y la posterior aparición de esta misma bacteria con resistencia a la meticilina. (Mattos, 2001)

Esta situación llevo al avance de la tecnología y al descubrimiento de nuevas sustancias que eran capaces de controlar a las bacterias con este fenómeno, apareciendo nuevos medicamentos como los aminoglucósidos, macrólidos y glicopéptidos, entre otros. Sin embargo, esto no es suficiente y cada vez aparecen nuevos mecanismos que son difíciles de controlar por estos medicamentos. (Sussmann P, 2001)

Se ha encontrado que la prevalencia de microorganismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento.

(Restrepo, 2001)

Desde el inicio de la era de los antibióticos (aparición de la penicilina) se ha descrito el fenómeno de la resistencia. Se destaca en los años sesenta la aparición de la resistencia a la meticilina y posteriormente diversos mecanismos de resistencia a los betalactámicos (betalactamasas de espectro extendido, neumococo resistente a la penicilina) y a vancomicina (*Enterococcus vancomicina* resistente, *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina) y la descripción de los diversos mecanismos de resistencia a las quinolonas dentro de los que se destacan los mecanismos de bombas de expulsión. (Restrepo,2001)

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente cuatro mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico (Restrepo, 2001), a saber:

- Inactivación del antibiótico
- Alteración del sitio blanco del antibiótico
- Barreras de permeabilidad
- Bombas de expulsión

Por todo ello, en este trabajo se evaluó la posible existencia de multiresistencia bacteriana a antibióticos en piel de 10 niños sanos de nivel preescolar de 4 y 5 años de edad. Para esto se realizó una plática con los padres de familia, la cual consistió en solicitar la autorización de estos, para que sus hijos participaran en el estudio, así como también se les explicó en que consistía este. Una vez obtenida la autorización se procedió a la toma de muestra la cual consistió en lo siguiente: se escogieron 5 zonas del cuerpo cubriendo las zonas húmedas: ombligo (zona B), grasosas: pliegue alar (zona A), y conducto auricular externo (zona E) y secas: espacio interdigital (zona C) y fosa poplítea (zona D).

Se encontró mayor incidencia de bacterias Gram positivas siendo *Staphylococcus coagulasa positivo* la más encontrada (69.7%) y la que presentó mayor porcentaje de resistencia a los antibióticos probados.

2. GENERALIDADES

Entre los diversos factores que han contribuido al incremento significativo de la expectativa de vida durante el siglo pasado se encuentra sin duda el control de numerosas enfermedades infecciosas gracias a intervenciones como vacunas y antibióticos, específicamente. La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con implicaciones sociales y económicas enormes, dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, el aumento de los costos de los tratamientos y de las largas estancias hospitalarias generadas. (W. van Veen, 2010)

El problema de la resistencia a los antibióticos es global, complejo, incluye un gran número de especies bacterianas de importancia médica y es de difícil control por su multicausalidad. El consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos. Los cambios en la ecología de las infecciones nosocomiales observadas en los hospitales desde la introducción de los agentes antimicrobianos han sido ampliamente documentados. (Plascencia, 2005)

Actualmente, se ha reportado en la literatura, que el 70% de las bacterias responsables de las infecciones nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas (Plascencia, 2005). El uso irracional de los antimicrobianos ha contribuido al aumento en la resistencia bacteriana. Las bacterias se adaptan rápidamente a las condiciones de su medio, aún en la presencia de estos fármacos. Los antibióticos difieren de los otros medicamentos porque no sólo ejercen un efecto terapéutico sino que alteran también la ecología de la biota del cuerpo y del medio externo.

La gran capacidad adaptativa de las bacterias es el resultado del efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y de la selección de las mismas, así como de su habilidad para intercambiar material genético tanto horizontalmente como vertical. (Ojeda, 2005)

En las últimas dos décadas se han incrementado las investigaciones para explorar las causas y las formas de controlar o prevenir la resistencia a los antibióticos.

Varios son los factores que han contribuido a su aparición:

- La prescripción libre de medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales.
- El uso generalizado de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis y duración inadecuadas de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes microorganismos teniendo en cuenta la biota local de cada institución o comunidad. (Ojeda, 2005)

2.1 PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

La pared celular de las bacterias Gram positivas está formada en un 90% por peptidoglicano, siendo éste el principal componente que permite diferenciarlas con la pared de las Gram negativas, pues al teñirlas, es gracias a él, que se logra mantener la coloración del cristal violeta en el interior de la célula.

Además del peptidoglicano, ésta se encuentra compuesta de ácidos teicoicos, que están presentes en pequeñas cantidades; éstos se presentan embebidos en la pared de la bacteria como polisacáridos ácidos. El término de ácidos teicoicos se refiere a los polímeros de la pared que contienen unidades de glicerolfosfato o de ribitolfosfato. Estos polialcoholes están unidos por ésteres fosfato y a menudo presentan unidos otros azúcares y D-alanina. Debido a su carga negativa, los ácidos teicoicos son en gran parte responsables de la carga negativa neta de la superficie de las células y puede intervenir en el paso de iones a través de la pared celular.

Algunos de estos ácidos que contienen glicerol están unidos a lípidos de la membrana de las bacterias Gram positivas y debido a esta íntima asociación con lípidos, estos ácidos teicoicos se denominan también ácidos lipoteicoicos.

Al microscopio electrónico aparece más gruesa porque tienen más peptidoglicanos (80% del peso seco). Tiene 40 capas a diferencia de 1 ó 2 de *E. coli*, que es una bacteria Gram negativa. Tiene un elevado grado de entrecruzamiento. No pierden el cristal violeta cuando se tiñen.

Las Gram positivas no tienen un gran espacio periplásmico y las proteínas de éste no están unidas, están ancladas a la membrana plasmática. Una vez que se forman estas proteínas se les añade un lípido y se anclan a la membrana pudiendo actuar hacia el exterior. Las proteínas de las Gram positivas pasan al medio de cultivo y se diluyen. (Brock, 2004)

2.2 PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por una membrana interna, una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Entre la membrana interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias. (Brock, 2004)

La membrana externa contiene diversas proteínas, siendo una de ellas las porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias. También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS), formadas por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina).

Las bacterias Gram negativas pueden presentar una capa S que se apoya directamente sobre la membrana externa, en lugar de la pared de peptidoglicano como sucede en las Gram positivas. Si presentan flagelos, estos tienen cuatro anillos de apoyo en lugar de los dos de las bacterias Gram positivas porque tienen dos membranas. No presentan ácidos teicoicos ni ácidos lipoteicoicos, típicos de las bacterias Gram positivas. (Vázquez, 2005)

2.3 ANTIBIÓTICOS

Un antibiótico es una sustancia química producida por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o derivada sintética de ella que destruye o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano. (Cordies Jackson, 1998)

2.3.1 CLASIFICACIÓN CON BASE AL EFECTO QUE EJERCEN SOBRE LA BACTERIA

a) Bacteriostáticos: aquéllos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento.

b) Bactericidas: poseen la propiedad de destruir a la bacteria, su acción terapéutica es irreversible.

Estas designaciones de bacteriostático o bactericida pueden variar según el tipo de microorganismo. Por ejemplo, la penicilina G suele ser bactericida para cocos Gram positivos, pero sólo es bacteriostático contra enterococos (*Enterococcus faecalis*), en tanto que el cloranfenicol suele ser bacteriostático, incluso a concentraciones muy altas. (Cordies Jackson, 1998)

Bactericidas	Bacteriostáticos
Penicilinas	Tetraciclinas
Cefalosporinas	Eritromicina
Aminoglucósidos	Sulfonamida
Rifampicina	Novobiocina
Quinolonas	Cloranfenicol
Monobactámicos	
Polimixinas	

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según el efecto que ejercen sobre la bacteria. (Cordies Jackson, 1998)

2.3.2 CLASIFICACIÓN CON BASE A SU MECANISMO DE ACCIÓN

1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.

Las bacterias son microorganismos hiperosmolares con respecto a los tejidos y al líquido intersticial de los mamíferos, por tanto, para mantener su integridad cuando infectan al hombre, necesitan una pared celular rígida. La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene habitualmente un efecto bactericida.

2. Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad.

La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria. Esta membrana tiene una estructura diferente para las bacterias y los hongos, que puede lesionarse por algunos productos, de esta forma se obtiene una actividad antimicrobiana.

3. Fármacos que inhiben la síntesis proteica (es decir, inhibición de la traducción y transcripción del material genético).

Algunos antibióticos como: cloranfenicol, lincomicina, aminoglucósidos y las tetraciclinas son capaces de inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias.

4. Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.

Las fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifampicina, novobiocina y los nitroimidazoles actúan por este mecanismo al inhibir de forma selectiva a la enzima RNA polimerasa dependiente del DNA, la cual cataliza la transcripción de la información genética contenida en el RNA mensajero y se convierte así en un potente bactericida. (Cordies Jackson, 1998)

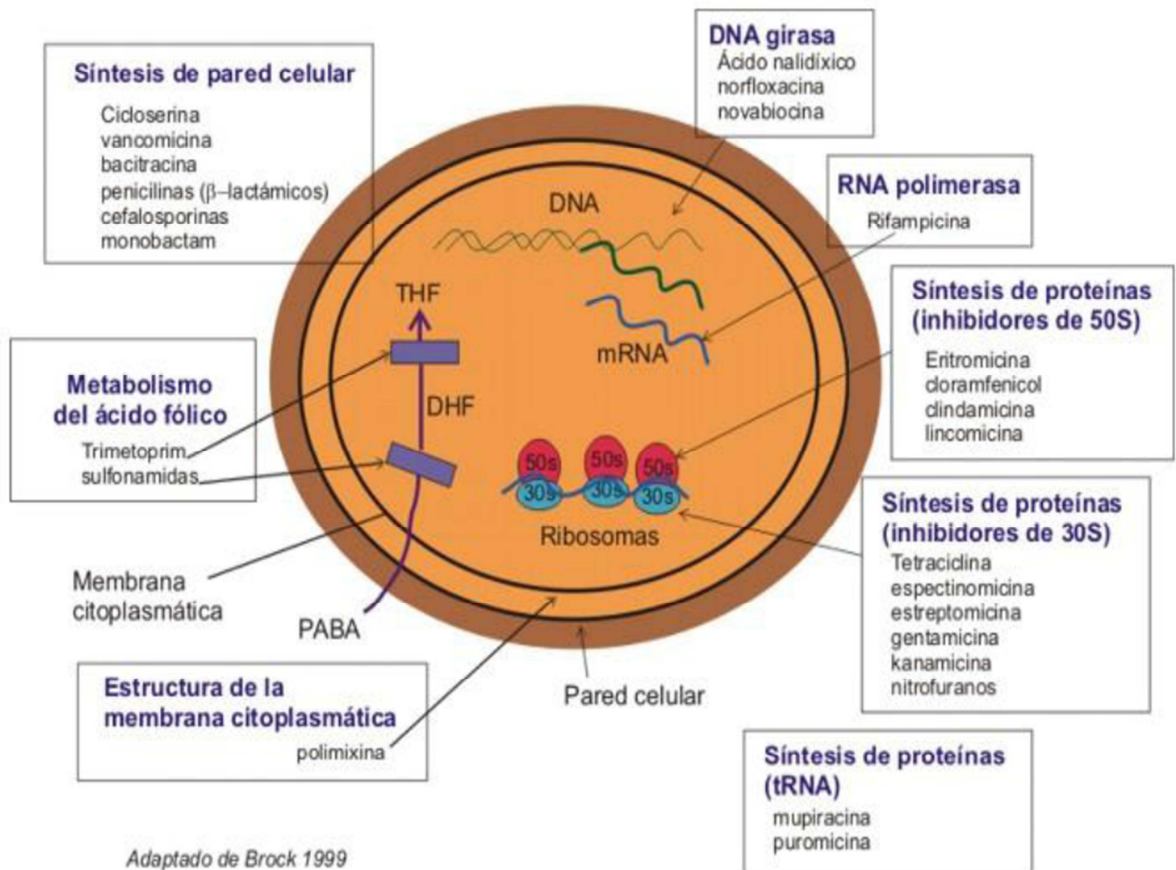


Figura 1. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.
(Machado Reyes, 1998)

I. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR
PENICILINAS
CEFALOSPORINAS
VANCOMICINA
FOSFOMICINA
TEICOPLANINA
BACITRACINA

II. LESIÓN EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR
POLIOMIXINAS
COLISTINAS
NISTATINA
ANFOTERICINA B

III. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA
CLORANFENICOL
TETRACICLINA
AMINOGLUCÓSIDOS
LINCOMICINAS
ERITROMICINA

IV. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS
QUINOLONAS
SULFONAMIDAS
RIFAMPICINA
TRIMETROPIN

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana. (Cordies Jackson, 1998)

2.3.3 AMPICILINA

La ampicilina es un antibiótico betalactámico que ha sido extensamente utilizado para tratar infecciones bacterianas desde el año 1961. En 1959 se descubrió que el epímero D de la aminopenicilina con un grupo fenil era el más activo de los derivados sintetizados se le llamo ampicilina. Es un antibiótico de la familia de las penicilinas de amplio espectro.

Farmacocinética

Administrada por vía oral, la ampicilina es absorbida, se une parcialmente a proteínas plasmáticas (15 a 25%) y es biodisponible en un 40%. Se excreta principalmente por el riñón.

Mecanismo de acción

Como todos los antibióticos betalactámicos, la ampicilina es capaz de penetrar bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas. Inhibe la síntesis de la pared celular de la bacteria en sus últimas dos etapas, uniéndose a las PBP (proteínas fijadoras de penicilinas), lo que lleva a la destrucción de la pared y lisis celular (PLM, 2010)

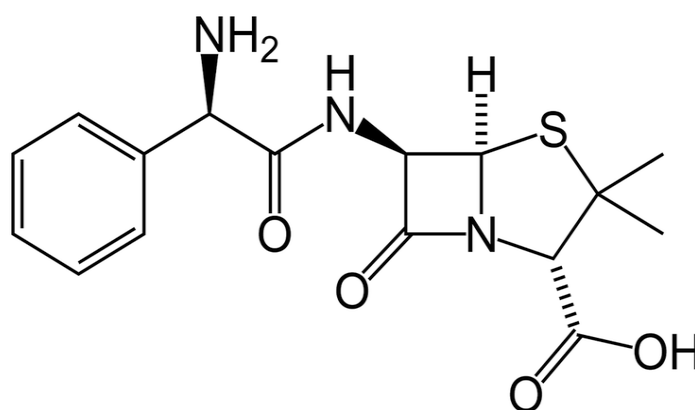


Figura 2. Estructura química de la ampicilina (FEUM, 2008)

2.3.4 DICLOXACILINA

La dicloxacilina es un antibiótico de la familia de los betalactámicos, es una penicilina resistente a penicilinasas. Ejerce su acción bactericida contra la mayoría de las infecciones causadas por las cepas *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Es efectiva contra *Staphylococcus aureus* productores de penicilinasas. Además, suele utilizarse para tratar ciertas infecciones causadas por las bacterias como la neumonía y otras infecciones en los huesos, oídos, piel y vías urinarias. De las isoxazolilpenicilinas, la dicloxacilina es la más activa y casi todas las cepas de *Staphylococcus aureus* son inhibidas por concentraciones de 0.05 a 0.8 µg/mL.

Actividad y mecanismo de acción

Antibacteriano contra bacterias Gram positivas, de la familia de las penicilinas. Resistente a β-lactamasas. Ejerce su acción bactericida sobre el crecimiento y división de la pared celular bacteriana, aunque aún no se conoce exactamente el mecanismo de acción implicado. Los peptidoglicanos mantienen la pared celular bacteriana rígida, protegiendo a la bacteria contra ruptura osmótica. Las bencilpenicilinas inhiben el paso final de la unión de peptidoglicano mediante su unión a transpeptidasas, proteínas fijadoras de penicilinas, que se encuentran en la superficie interior de la cubierta celular bacteriana, inactivándolas. Otros mecanismos implicados: lisis bacteriana a causa de la inactivación de inhibidores endógenos de autolisinas bacterianas. (PLM, 2010)

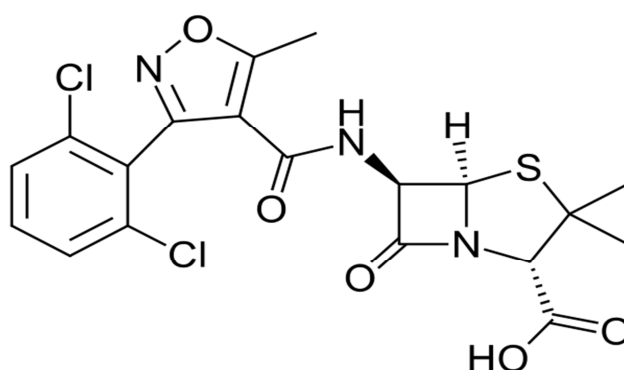


Figura 3. Estructura química de la dicloxacilina. (FEUM, 2008)

2.3.5 CEFOTAXIMA

La cefotaxima es una cefalosporina semisintética de tercera generación que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo que causa lisis de la misma. La actividad bactericida de la cefotaxima resulta de la inhibición de la síntesis de la pared celular. La cefotaxima tiene una actividad *in vitro* en contra de una gran cantidad de cepas Gram positivas y Gram negativas.

Se ha demostrado que la cefotaxima es un potente inhibidor de las β -lactamasas producidas por cierto tipo de bacterias Gram negativas. La cefotaxima sódica es usualmente activa en contra de los siguientes microorganismos, tanto *in vitro*, como en infecciones clínicas: aerobios Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, incluyendo cepas productoras y no productoras de penicilinas, *Staphylococcus epidermidis*, especies de *Enterococcus*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo β -hemolítico del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Streptococcus pneumoniae*.

Aerobios Gram negativos: especies de *Citrobacter*, especies de *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* (incluyendo aquéllos resistentes a las ampicilinas), *Haemophilus parainfluenzae*, especies de *Klebsiella* (incluyendo las cepas productoras y no productoras de penicilinas), *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus inconstans* grupo B, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, especies de *Serratia* y especies de *Acinetobacter*. (PLM, 2010)

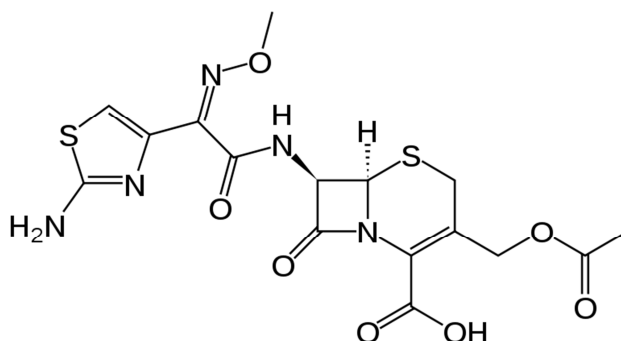


Figura 4. Estructura química de la cefotaxima. (FEUM, 2008)

2.3.6 CEFTRIAXONA

La ceftriaxona es un antibiótico cuya actividad bactericida resulta de la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana. La ceftriaxona ejerce actividad *in vitro* contra una amplia gama de microorganismos Gram negativos y Gram positivos. La ceftriaxona es altamente estable a la mayoría de las β -lactamasas, ambas penicilinas y cefalosporinas, de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La ceftriaxona es usualmente activa contra los siguientes microorganismos *in vitro* y en infecciones clínicas.

Aerobios Gram positivos: *Staphylococcus aureus* (sensible a meticilina), estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus pyogenes* (β -hemolítico, grupo A), *Streptococcus agalactiae* (β -hemolítico, grupo B), estreptococos β -hemolíticos (ningún grupo A o B), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*.

Nota: Los estafilococos resistentes a meticilina son resistentes a las cefalosporinas, incluida la ceftriaxona. Por lo general, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* son resistentes.

Aerobios Gram negativos: *Acinetobacter*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, otras especies del género *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus vulgaris* (PLM, 2010)

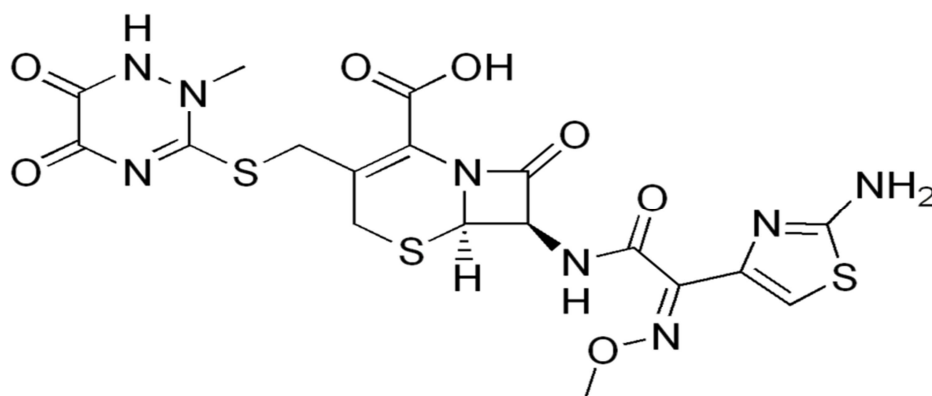


Figura 5. Estructura química de la ceftriaxona (FEUM, 2008)

2.4 INTERACCIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS

Las interacciones de los antibióticos sobre los microorganismos pueden producir: sinergismo, adición, competencia, antagonismo y el llamado efecto post-antibiótico.

Sinergismo

Cuando la acción bacteriana y/o bacteriostática de 2 o más antibióticos es mayor que la que se obtiene con cada una de los fármacos utilizados individualmente. Son sinérgicas las combinaciones que actúan a diferentes niveles de la estructura bacteriana, por ejemplo penicilinas y aminoglucósidos, las primeras inhiben la síntesis de la pared celular mientras que los aminoglucósidos, inhiben la síntesis proteica.

Adición

Cuando el efecto de una combinación de medicamentos es igual al que se produce con cada uno de los medicamentos utilizados individualmente; un efecto aditivo eficaz puede lograrse combinando 2 betalactámicos (carbenicilina y cefalotina).

Competencia

La competencia se establece cuando se utilizan 2 antibióticos y uno de ellos es más eficaz que los 2 juntos, constituye un ejemplo clásico, la asociación de penicilina y cloranfenicol.

Antagonismo

Este fenómeno se produce cuando el efecto de un fármaco contrarresta el del otro. El ejemplo de antagonismo más frecuente entre 2 antibióticos se refiere a la combinación de un bactericida activo en la pared celular (penicilina) con un bacteriostático potente que inhiba la síntesis proteica (tetraciclina), porque para que los medicamentos tipo penicilinas ejerzan su efecto mortal, es necesario que las células estén en crecimiento.

Efecto post-antibiótico

El seguimiento de la cinética de crecimiento de microorganismos expuestos a la acción de antimicrobianos permite comprobar la persistencia en la inhibición del crecimiento bacteriano de los supervivientes en un medio libre de antibióticos.

Este efecto es variable en su duración, además, del microorganismo de que se trate.

El efecto post-antibiótico significa que aun cuando no se erradiquen los microorganismos, éstos no proliferan nuevamente durante varias horas después de exponerlos a una concentración por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se ha demostrado además que en la fase de exposición post-antibiótica, los microorganismos son más sensibles a la destrucción por los leucocitos. (Cordies Jackson, 1998)

2.5 CRITERIOS PARA LA UTILIZACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Ciertos patrones de uso indiscriminado de los antibióticos afectan en gran medida al número de microorganismos resistentes que se desarrollan. El uso excesivo de las cefalosporinas de segunda y tercera generación acelera de manera importante el desarrollo de resistencia a la meticilina.

Entre los factores que contribuyen a la resistencia se encuentran: diagnósticos incorrectos, prescripciones innecesarias, uso incorrecto de antibióticos por parte de los pacientes, uso de los antibióticos como aditivos en la alimentación del ganado para aumentar su peso, etc.

El objetivo fundamental del tratamiento antimicrobiano es destruir o inhibir el crecimiento de un patógeno infectante sin causar daño al huésped, por lo que debe existir una interacción entre el huésped infectado, el microorganismo y el antibiótico que se utiliza. Es necesario tener en cuenta además, que las bacterias durante el tratamiento pueden cambiar sus propiedades patogénicas hacia el huésped, y desarrollar mecanismos de resistencia. Los aspectos más importantes a tener en cuenta al momento de seleccionar el antibiótico adecuado son:

1. Identificación y sensibilidad del microorganismo para seleccionar el antibiótico.
2. Reconocimiento de los factores que dependen del huésped y que son capaces de modificar la eficacia terapéutica.
3. Vías de administración, dosis, costos y complicaciones del tratamiento antimicrobiano. (Ronald RA, 1999)

Antes de iniciar el tratamiento es aconsejable identificar al microorganismo infectante, pero en casi todas las circunstancias, no será posible disponer de la comprobación del cultivo y de pruebas *in vitro*, de sensibilidad antimicrobiana, cuando menos por unos días.

En las situaciones en que sea posible, podemos auxiliarnos de pruebas simples como la tinción de Gram, la cual puede brindar una orientación inicial para la selección del antibiótico; se hace énfasis en este proceder de fácil realización, bajo costo y probada confiabilidad, el cual con frecuencia no es utilizado.

Existen algunas características del huésped que deben tenerse en cuenta al momento de elegir el antibiótico. La edad es un factor fundamental, puesto que las edades límites plantean situaciones particulares, así por ejemplo en los individuos de la tercera edad, las infecciones sobre todo bacterianas son muy graves y se complican con frecuencia; además, en este grupo el diagnóstico de infección bacteriana puede ser más difícil que en el adulto joven y no debe olvidarse al momento de iniciar el tratamiento, que la toxicidad particular de algunos antibióticos puede ser más elevada en el anciano, ejemplo de esto son la nefrotoxicidad y ototoxicidad de los aminoglucósidos y el aumento de riesgo de la sobrecarga de volumen al emplear antibióticos que contienen abundante sodio (ticarcilina y carbamicina). (Petersdor RG, 1997)

Las alteraciones genéticas y del metabolismo pueden interferir en los efectos terapéuticos de algunos antibióticos. En las infecciones relacionadas con obstrucción de vías urinarias, respiratorias o biliares, la penetración antimicrobiana a estas zonas es pobre, lo que sucede también en presencia de cuerpos extraños (sondas, válvulas y prótesis) y abscesos donde las bacterias proliferan lentamente y el antibiótico puede ser destruido por enzimas elaboradas por los microorganismos.(Cordies Jackson, 1998)

Las alteraciones de la función renal y hepática influyen de manera decisiva sobre el empleo de estos fármacos. La mayoría de los antibióticos de uso común se eliminan sobre todo por el riñón; algunas excepciones incluyen la eritromicina y el cloranfenicol. Las concentraciones suelen ser más altas en orina y bilis que en suero, por lo que en la insuficiencia renal y hepática es necesario hacer ajustes posológicos.

En el riñón, los factores de los cuales depende la excreción del antibiótico son: el flujo sanguíneo renal, la filtración glomerular y el transporte transtubular; así por ejemplo los aminoglucósidos se eliminan por la filtración glomerular y las penicilinas por secreción tubular activa.

Varios de los antibióticos de uso más frecuente se metabolizan en el hígado y se excretan por la bilis; tal es el caso de las sulfonamidas, el cloranfenicol y la tetraciclina, por lo que debe también ajustarse la dosis o no administrarse cuando existe una hepatopatía aguda o crónica.(Cordies Jackson, 1998)

2.6 RECOMENDACIONES PARA EL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS

- ✓ Siempre que sea posible utilizar un solo antibiótico.
- ✓ Utilizar antibióticos sólo en caso necesario y asegurarse de que se trata de una infección bacteriana.
- ✓ Efectuar antibiogramas del microorganismo siempre que sea posible
- ✓ No interrumpir un tratamiento una vez iniciado.
- ✓ Evitar los antibióticos de última generación a fin de resguardarlos para su uso en casos extremos.
- ✓ No usar antibióticos de la misma familia.
- ✓ En casos de sepsis graves usar bactericidas.
- ✓ No utilizar antibióticos sin conocer su toxicidad.
- ✓ No utilizar antibióticos de alta toxicidad en pacientes ambulatorios.
- ✓ Si en el cultivo el microorganismo es sensible a un antibiótico específico que hemos utilizado anteriormente y la respuesta clínica es satisfactoria, puede valorarse con el mismo régimen de tratamiento.
- ✓ El último antibiótico que aparece en el mercado no es necesariamente el mejor.

2.7 ANTIBIOGRAMAS

Los antibiogramas son reportes de pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y están indicados para cultivos bacterianos clínicamente relevantes (por ejemplo: fluidos normalmente estériles o sitios clínicamente infectados) cuando la susceptibilidad no puede ser predecida.

Existen ahora numerosos métodos estandarizados por el National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

1. Método de dilución en placa o en caldo: es el estándar de oro de las pruebas *in vitro*. En este, un inóculo bacteriano (usualmente 10⁵ unidades formadoras de colonias) determinado se expone a diluciones seriadas del antibiótico por 18 a 24 horas. El resultado se expresa en concentración mínima inhibitoria (CMI) que es la menor concentración en microgramos por mililitro que inhibe el crecimiento de microorganismos. En general la susceptibilidad es definida como una CMI que es equivalente o menor a de un dieciseisavo a un cuarto de la concentración pico sérica.
2. Prueba de dilución en agar: sigue los mismos principios excepto que las bacterias son inoculadas en cajas Petri. La CMI es definida como la menor concentración a la cual no se observan colonias, tiene como desventaja el mayor costo y el no brindar una información cuantitativa.
3. Método de difusión en disco: se emplean discos de papel impregnados de antibiótico localizados en zonas libres de microorganismos con dosis seriada. Observando el tamaño del halo de inhibición de crecimiento se puede obtener resultados semicuantitativos. La sensibilidad está determinada por el diámetro del halo cuya lectura viene estandarizada. (Machado Reyes 1998)

2.8 DAÑOS AL AMBIENTE POR USO DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos en el medio ambiente también pueden dañar los procesos naturales necesarios para el ciclo de los elementos esenciales en la biosfera. Los resultados son alarmantes ya que los compuestos activos se depositan en el lodo de las aguas residuales pasando de allí a los suelos y a los cuerpos de agua, permaneciendo en ellos durante varios años.

Las características químicas de estos compuestos los convierten en sustancias muy estables, difíciles de degradar. A esto se agrega que algunos son hidrófobos y que suelen adherirse a otras partículas, haciéndose más y más resistentes y fáciles de ser llevados por las aguas o por el viento. (Vázquez, 2005)

Cuando tomamos un antibiótico para eliminar una infección, en gran medida su carga efectiva se agota en el interior del cuerpo. Pero, una parte es desechada por la orina y las heces, llegando al ambiente (mares, ríos, cuencas cerradas, sistemas lacustres, pozos negros) con su poder antimicrobiano activo. Lo mismo ocurre cuando desinfectamos nuestro hogar o nos lavamos las manos con jabones antisépticos, cuyos principios activos se escurren por las cañerías. (Plascencia, 2005)

En los ambientes adonde llegan finalmente, suceden dos cosas: la primera es la muerte de numerosos microorganismos, que de hecho, resultan ser la base de la cadena trófica de los ecosistemas. Muchos de los compuestos pueden dañar a un grupo importante de bacterias benéficas, que son los encargados de realizar procesos biogeoquímicos imprescindibles para el reciclaje de nutrientes.

La segunda consecuencia es la generación de resistencia de las bacterias a esos antimicrobianos, que induce al empleo de mayores concentraciones de antibióticos para su tratamiento en los organismos vivos, llegando a límites peligrosamente cercanos a la intoxicación. (Vázquez, 2005)

El tipo de antimicrobianos que son los más perjudiciales para el ambiente son los β -lactámicos, las sulfas, las fluoroquinonas y el cloranfenicol. La mayoría de los antimicrobianos que persisten en el agua o en el suelo son de amplio espectro, por lo que perjudican a los ecosistemas ya que pueden matar a los microorganismos degradadores tan importantes en la mineralización de la materia orgánica y producción de nutrientes. Son dañinos para los productores primarios necesarios para que fluya la energía en los ecosistemas y permita sostener la diversidad. Además, los que no se mueren pueden adquirir material genético para resistir, este material lo pueden transmitir en forma vertical u horizontal a otros microorganismos potencialmente patógenos para el hombre. (Vázquez, 2005)

Entre los antimicrobianos encontramos los siguientes:

- Antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios, entre los cuales están los antihelmínticos y antivirales.
- Desinfectantes: se aplican para eliminar la posible carga microbiana.
- Antisépticos: Controlan y reducen microorganismos patógenos y son de aplicación externa en los seres vivos, tópicamente en piel o mucosas.
- Antimicrobianos de uso sistémico: atacan a los microorganismos que han colonizado tejidos vivos, siendo incorporados oralmente, absorbidos a través de la piel o inyectados

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó, en septiembre de 2001, su WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance e invitó a los países miembros a la adopción de medidas para limitar la diseminación de la resistencia a los antibióticos. Se propuso entonces la inclusión de la vigilancia de la resistencia a los antibióticos, y la obligatoriedad del reporte sobre resistencia a estos fármacos en las revisiones de las regulaciones internacionales de la salud. (Plascencia, 2005)

2.9 RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana continúa en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en los hospitales. Se calcula que entre el 50% y el 60% de más de dos millones de infecciones hospitalarias en los Estados Unidos son causadas por bacterias resistentes, y que son responsables de cerca de 77,000 muertes por año. (D'Costa, 2006)

Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen una variedad de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica, es importante conocer los mecanismos de resistencia más prevalentes en las bacterias Gram negativas. (D'Costa, 2006)

La resistencia se define como el crecimiento reproducible en presencia de antibióticos. El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. De esta manera puede observarse la resistencia desde el ambiente biológico y del bioquímico. Se entiende por resistencia, el mecanismo a través del cual, la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos. (Hughes, 2006)

2.9.1 RESISTENCIA NATURAL

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionados con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprin sulfametoxazol; bacilos Gram negativos aeróbicos a clindamicina.

2.9.2 RESISTENCIA ADQUIRIDA

Ocurre cuando se produce una mutación cromosómica o la bacteria adquiere un plásmido de resistencia, es decir, un fragmento extracromosómico de DNA portador de genes que modifican la resistencia al antibiótico. La información genética presente en algunos plásmidos, es un factor importante en la patogenicidad o la invasividad de las bacterias, en la velocidad de aparición de cepas patógenas o invasivas resistentes a los antibióticos y en la evolución del cuadro clínico. Por lo tanto, la resistencia mediada por intercambio genético se considera la forma más eficaz y poderosa de propagación de la información genética la cual se da por intercambio de los plásmidos (plásmidos R o factor R). Estos factores R son plásmidos conjugativos que confieren a los microorganismos resistencia frente a fármacos. (Maranan M.C., 1997)

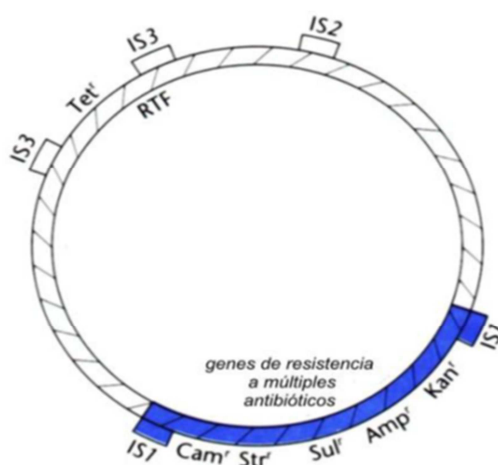


Figura 6. Primer plásmido multiresistente R1 o NR1, aislado en Japón en 1957
(Maranan M.C., 1997)

El factor R posee dos componentes diferentes: el factor de transferencia de resistencia (FTR), que controla el proceso de conjugación, y el determinante r, que está formado por uno, o más genes, que confieren la resistencia frente a drogas específicas.

También existen plásmidos que otorgan a los microorganismos la capacidad de resistencia frente a antibióticos y no poseen el factor FTR, por lo que no son conjugativos o “autotransferibles”.

Generalmente son transferidos por transducción o por plásmidos conjugativos corresidentes. La transferencia de genes que codifican la resistencia antibiótica también se puede realizar mediante transposones e integrones.

Una vez que se genera el cambio en la información genética, las bacterias resistentes pueden transmitirse los nuevos genes a través de transferencia horizontal por intercambio de elementos genéticos transferibles (plásmidos, islas de patogenicidad, fagos, transposones.) (W. van Veen, 2010)

2.9.3 RESISTENCIA RELATIVA O INTERMEDIA

Ocurre un incremento gradual de la CMI (concentración mínima inhibitoria) a través del tiempo. Para obtener un efecto terapéutico es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados. La susceptibilidad o resistencia de la bacteria es en este caso dependiente de concentración.

2.9.4 RESISTENCIA ABSOLUTA

Sucede un incremento súbito en la CMI de un cultivo durante o después de la terapia. Es inefectivo el incremento de la dosis clínica usual. Ejemplo de ello es la *Pseudomonas spp.* resistente a gentamicina y el *Streptococcus pneumoniae* altamente resistente a penicilina y uso de levofloxacina.

2.9.5 PSEUDORESISTENCIA

Ocurre una resistencia *in vitro* pero una gran efectividad *in vivo*. Se denomina tolerancia antibiótica al fenómeno en el cual la diferencia entre la CBM (concentración bactericida mínima) y la CMI es muy grande lo cual ocurre con relaciones CBM/CMI mayores de 8 lo que permite la persistencia del microorganismo. (W. van Veen, 2010)

2.10 ELEMENTOS MÓVILES DE RESISTENCIA ADQUIRIDA

El fenómeno biológico de la resistencia depende de la aparición y conservación de los genes de resistencia, como elementos génicos cromosómicos y extracromosómicos.

En pocas palabras es la modificación en el genoma lo que determina la aparición de dichos genes; estos cambios se clasifican en microevolutivos y macroevolutivos. Los primeros son el resultado de mutaciones únicas que comprometen nucleótidos apareados, mientras que los macroevolutivos afectan segmentos de ADN.

Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia. Los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano con longitud variable, algunos con capacidad para replicarse independiente de la maquinaria genética que dispone la célula, lo que les da el apelativo de conjugativos y no conjugativos según esta capacidad. (W. van Veen, 2010)

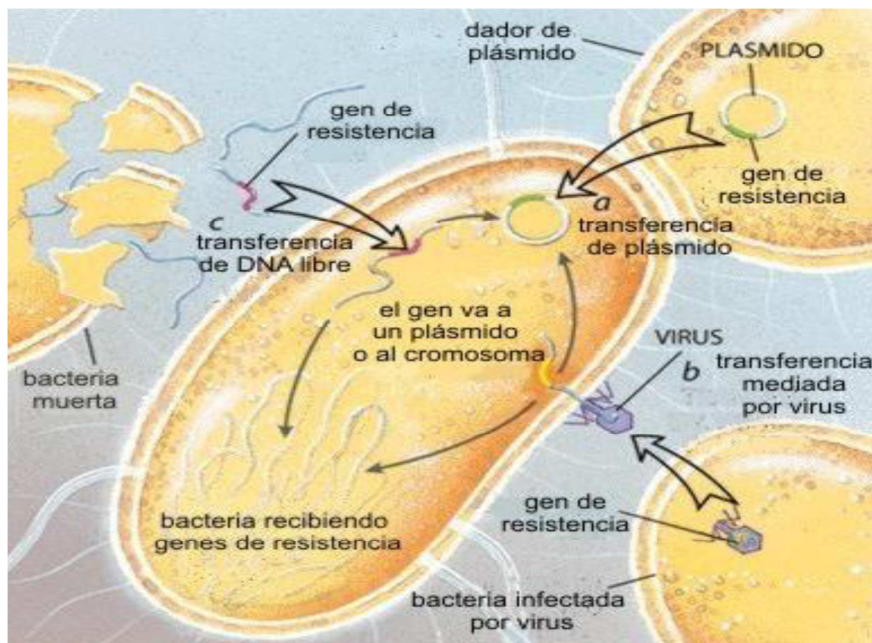


Figura 7. Elementos móviles de resistencia adquirida (W. van Veen, 2010)

Por otro lado los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser translocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio. Esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra, durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia

Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una resistencia a varios antibióticos (resistencia múltiple). (Cordies Jackson, 1998)

2.11 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden clasificarse en 4 grupos.

2.11.1 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. (W. van Veen, 2010)

En estos casos el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el citoplasma, es ésta la forma más frecuente de resistencia natural

Las barreras de permeabilidad incluyen tres componentes básicos:

- La estructura de la membrana externa de la bacteria.
- Las porinas: canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular.
- Características fisicoquímicas del antimicrobiano. En el caso de los medicamentos hidrofílicos requieren presencia de porinas para su transporte al interior de la célula.

Existe fundamentalmente un mecanismo de resistencia que es la entrada disminuida del fármaco por factores como:

- Permeabilidad de la membrana externa: claramente definida en los microorganismos Gram negativos que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antibiótico.

- Permeabilidad de la membrana interna: otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de la capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.
- Porinas: son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria. De la modificación por mutación de estas proteínas puede generarse una disminución del paso del antibiótico. Éste es el mecanismo empleado por *Salmonella typhimurium* (OmpC) contra cefalosporinas de primera generación, *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenem. (Hughes, 2006)

La permeabilidad de la pared celular está determinada por la naturaleza de ésta. En las bacterias Gram positivas, esta pared usualmente no es una barrera que impide la penetración de los antibióticos; sin embargo, en las Gram negativas, representa una barrera difícil de vencer y que varía según las diferentes especies; así por ejemplo, la pared celular es más permeable en algunas especies de *Neisseria* y *H. influenzae*, que la *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Proteus indolpositivo*. (Katherine M, 2006)

En *Escherichia coli* y otras bacterias entéricas, una proteína específica (porinas) impide la entrada de antibióticos hidrófilos con un peso molecular de hasta 650 Daltons. Ejemplos de resistencia por disminución de la permeabilidad son la resistencia de los bacilos Gram negativos a la penicilina G, la eritromicina, la clindamicina y la vancomicina, así como la resistencia de los estreptococos, *P. aeruginosa* y otras bacterias anaerobias a los aminoglucósidos. (Hughes, 2006)

2.11.2 MODIFICACIÓN O INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación. (Gerard D, 2006)

La modificación o inactivación del antibiótico, está determinado en gran medida por la producción de enzimas: las betalactamasas. Son ejemplos de esta la producción de β -lactamasa, β -lactamasa de amplio espectro, eritromicina estereasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloranfenicol, lincosamidas y estreptograminas. (Donald W. 2006)

En el caso de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos codificadas por plásmidos, las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetiltransferasa (AAC), fosfatidiltransferasa (APH) y adeniltransferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglicósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30S ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas. (Gerard D, 2006)

Otro sitio de acción de los antibióticos es la síntesis de proteínas. Este proceso puede inhibirse al atacar a los componentes nucleares de la replicación del ADN y la transcripción del ARN. Por ejemplo, las quinolonas inhiben la topoisomerasa, enzima encargada del desdoblamiento del ADN para su replicación. Asimismo, la síntesis de proteínas, llevada a cabo en los ribosomas, puede ser inhibida por fármacos como los aminoglucósidos, las tetraciclinas, la clindamicina, los macrólidos y el cloranfenicol. (Maranan M.C., 1997)

La resistencia a las quinolonas ha venido en aumento y se cree que, en parte, puede explicarse por su amplio uso en la industria alimentaria. Usualmente se debe a alteraciones cromosómicas aunque recientemente se ha asociado a genes transmitidos por plásmidos.

Se han encontrado genes tipo *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en plásmidos, cuyos productos bloquean la acción de la ciprofloxacina sobre la girasa y la topoisomerasa IV del ADN.

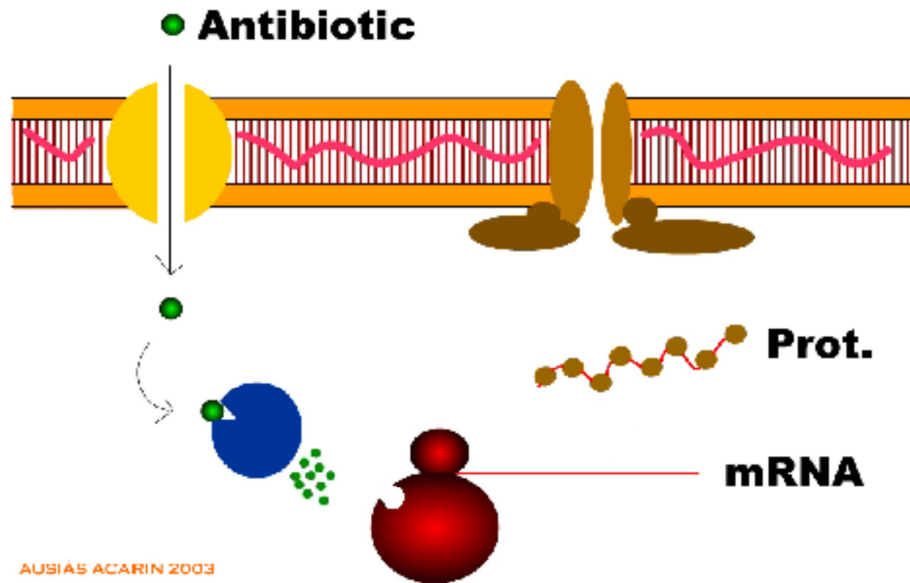


Figura 8. Modificación o inactivación del antibiótico (Maranan M.C., 1997)

Las lactamasas representan un grupo diferente de enzimas producidas por bacterias Gram positivas, Gram negativos aerobios y anaerobios capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico e inactivar el antibiótico correspondiente.

Sabemos que los antibióticos, β -lactámicos como penicilina, oxacilina o cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanincaroipeptidasa (PBPS) encargada de la síntesis de la pared. La β -lactamasa hidroliza el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo.

Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producidas por bacterias Gram negativas, para las cuales se han elaborado múltiples clasificaciones, siendo la más aceptada la de Bush.

Pueden clasificarse de acuerdo con su forma de producción en cuatro grupos:

- Por localización genética (cromosomas o plásmidos).
- Por exposición genética (constitutiva o inducida).
- Por producción primaria (dependiente de microorganismo).
- Por sustrato mayor (depende de la clase de antibiótico). (Hughes, 2006)

Abraham y Cham, en 1940, publicaron los primeros informes en relación con su mecanismo de acción. Se ha demostrado que constituye un factor importante de resistencia de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis* y algunas enterobacterias. (Donald W.2006)

La información genética para la síntesis de estas enzimas puede estar contenida en un cromosoma o en un plásmido y su producción puede ser una característica del microorganismo (tasa de producción constante), aunque también la misma puede ser inducida en presencia de un sustrato apropiado.

Igualmente por su amplia difusión se deben reconocer algunas codificadas por plásmidos:

- Enzimas de amplio espectro que hidrolizan las bencilpeni-cilinas y cefaloridina.
- Oxacilinasas que degradan oxacilinas y similares (OXA-1, OXA-2) la tipo A producida por *Staphylococcus aureus*, enterobacterias (TEM-1, SMV-1) éstas últimas (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente) de alta importancia pues codifican la β -lactamasa de amplio espectro capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación.
- Carbecilinasas que hidrolizan penicilina

Otra vía para inactivación del antibiótico es la “modificación enzimática” del mismo. Este es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas en plásmidos.

Entre las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetiltransferasa (AAC), fosfatidiltransferasa (APH) y adeniltransferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglucósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30s ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas.

El mecanismo de resistencia a eritromicina es común a lincosamidas y estreptograminas (grupo MLS). La producción de eritromicina esterasas, cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Se han descrito esterasas I y II confinadas a Gram negativos.

La modificación del cloranfenicol la realiza una enzima intracelular, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), existente tanto en Gram positivos como en Gram negativos. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol a la subunidad ribosomal 50S. (Hughes, 2006)

2.11.3 ALTERACIONES DEL SITIO DONDE LOS ANTIBIÓTICOS EJERCEN SU ACCIÓN

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas que unen penicilinas. Estos mecanismos de resistencia se refieren a las modificaciones producidas en la estructura o paso metabólico sobre los que ejercen su acción, bien por incremento de la concentración de una sustancia competitiva, o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas alternas.

La tolerancia, si bien no es considerada propiamente un mecanismo de resistencia, puede en la práctica comportarse como tal. La tolerancia se define como la existencia de una CBM muy superior a la CTM y se atribuye a la selección de mutantes deficientes en sistemas autolíticos. Probablemente, las dosis altas destinadas a conseguir niveles muy superiores a la CMI del microorganismo reduzcan la selección de estas subpoblaciones, por lo que, cuando se sospecha la existencia de ésta es necesario prolongar el tiempo de duración del tratamiento. (Hamilton, 1998)

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc. De esta manera, la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares conferirán resistencia a los β -lactámicos, dado que es esta enzima su sitio de acción.

La resistencia a las quinolonas de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* obedece a la modificación por mutación de los genes GyrA y Gyr B que codifican para las topoisomerasas II y IV. Característicamente, las mutaciones mencionadas se tienen localizaciones cromosómicas y no en plásmidos. (Cordies Jackson, 1998)

2.11.4 BOMBAS DE EXPULSIÓN

A finales de la década de 1980 se descubrieron los primeros sistemas de expulsión activa en procariotas (tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas). (Opazo C., 2009)

La resistencias a los medicamentos debido a bombas de expulsión fue descubierta con la resistencia común a tetraciclina por la proteína teta en bacterias Gram negativas, que catalizan a través de un sistema antiporte hacia el exterior al antibiótico; a esto se agrega la utilización de una fuerza protón-motriz dependiente del bombeo de un complejo tetraciclina-Mg. (Mella M, 2009)

Las bombas de expulsión han sido reconocidas por muchos años y están presentes en todo tipo de célula. Su popularidad ha venido en aumento concomitantemente con la creciente evidencia que las implica como responsables de resistencia contra antimicrobianos, no sólo en bacterias, sino también en otros patógenos comunes como los parásitos (*Plasmodium spp.*, por ejemplo). (Bello T, 2009)

Se denominan bombas de expulsión a una serie de transportadores que son capaces de expulsar, de manera relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados estructuralmente. Es debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas, donde se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo.(Opazo C., 2009)

Estas bombas operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas aunque también se encuentran en bacterias Gram positivas.

Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas diferentes, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos. Para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. (Bello T, 2009)

El principal papel de este mecanismo parece ser el mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula.

Las bombas de salida pueden ser específicas para un fármaco (generalmente, codificadas en plásmido y, por lo tanto, transmisibles) o inespecíficas (generalmente expresadas en el cromosoma bacteriano).

Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos empleándose un solo mecanismo.

Usualmente las bombas de expulsión causan pequeños aumentos en las CMI; sin embargo, cuando aparecen simultáneamente varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínicamente evidente. (Mella M, 2009)

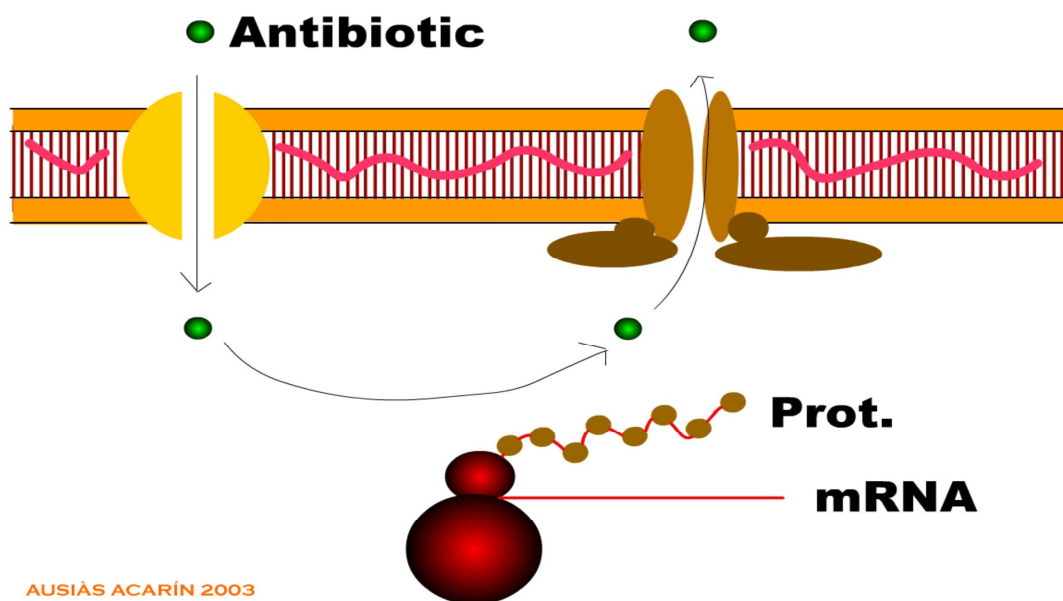


Figura 9. Bombas de expulsión (Maranan M.C., 1997)

Este es uno de los recientes mecanismos descritos para explicar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Este mecanismo es capaz de eliminar varios tipos o familias de antibióticos, por lo que también se ha denominado bombas de expulsión activa a multifármacos.

Son bombas metabólicas que eliminan activamente productos del metabolismo celular o tóxicos (antibióticos). Su sobreexpresión desencadena resistencia cruzada pero generalmente de bajo nivel a varias familias de antibióticos, como: β -lactámicos, quinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas. Cuando se asocian a la disminución de la permeabilidad presentan una resistencia de alto nivel o multiresistencia. (Hooper DC, 2000)

Los transportadores que permiten este mecanismo están regulados, algunas veces por el ADN del cromosoma bacteriano, otros por el ADN plasmídico, y otras por ambos. Además la coexistencia de alteraciones en las porinas de entrada con un sistema eficaz de expulsión activa, eleva marcadamente el grado de resistencia a los antibióticos.

Una amenaza grave puede ser la aparición de patógenos Gram negativos que son resistentes a prácticamente todos los agentes antimicrobianos disponibles. Por lo tanto, casi no hay agentes que puedan ser usados contra estas cepas, ya que existe una barrera de membrana externa de baja permeabilidad y un conjunto de eficaces bombas de expulsión de múltiples fármacos, los cuales se combinan con una multitud de mecanismos de resistencia específicos.

Las bombas de expulsión corresponden a una clase de transportadores involucrados en la captación de nutrientes esenciales y iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente, y se encuentran clasificados en cinco grandes familias. (Nikaido, 2009)

Dos de estas corresponden a las superfamilias conocidas como ABC (ATP-binding cassette) y MFS (major facilitator superfamily). Las otras corresponden a las familias RND (resistance-nodulation-cell division), MATE (multidrug and toxic compound extrusion) y SMR (small multidrug resistance).

Una diferencia importante entre las distintas familias corresponde a la fuente de energía para expulsar distintos sustratos. Los transportadores de la superfamilia ABC son dependientes de la hidrólisis de ATP para expulsar los distintos compuestos; en cambio, los transportadores de la familia MATE utilizan un gradiente electroquímico otorgado por Na^+ o H^+ .

Por otro lado, las bombas de expulsión pertenecientes a la superfamilia MFS y a las familias RND y SMR utilizan la fuerza protón-motriz para ejercer su función. (Nikaido, 2009)

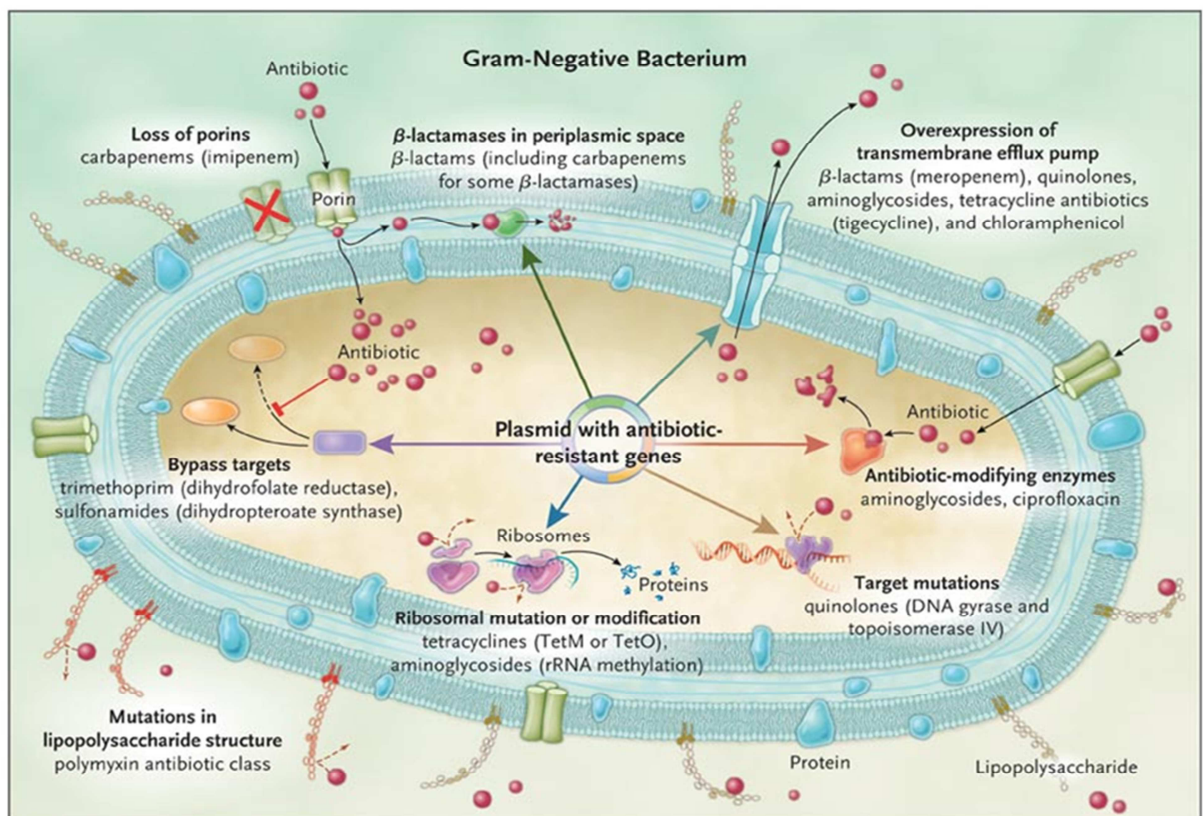


Figura 10. Esquema de bombas de expulsión (Maranan M.C., 1997)

2.11.4.1 BOMBAS DE EXPULSIÓN PERTENECIENTES A LA SUPERFAMILIA MFS

Consisten en sistemas compuestos por una sola proteína de membrana, presentes tanto en eucariontes como en procariontes, transportando sustratos a través de la membrana citoplasmática, de acuerdo a tres mecanismos: simporte, antiporte y uniporte. El proceso de simporte corresponde al transporte de dos o más tipos de sustratos en la misma dirección simultáneamente, el antiporte representa el transporte de dos o más tipos de sustratos en direcciones contrarias simultáneamente, mientras que el uniporte es el transporte de un solo tipo de sustrato a través de la membrana.

En *Staphylococcus aureus* se ha identificado el transportador norA del sistema MFS y en *Escherichia coli* el operón AcrA-AcrB es sumamente interesante, pues utiliza la porina TolC, que es un mecanismo compartido con otros sistemas exportadores celulares, lo que demuestra la capacidad bacteriana de ahorrar sistemas de expulsión. (Oliveira D, 2007)

La salida activa de medicamentos ha sido conocida por jugar un papel predominante en la resistencia a ciertos fármacos individuales, tales como la tetraciclina. El análisis de cepas de *S. aureus* que fueron resistentes a múltiples bactericidas catiónicos y que causaban infecciones nosocomiales mostraron, que estas cepas contenían plásmidos que codifican para un transportador de expulsión multifármaco QacA (o QacB), perteneciente a la superfamilia MFS. La primera bomba de expulsión multifármaco identificada en bacterias. Desde entonces, las bombas de expulsión de múltiples fármacos pertenecientes a varias familias han sido descubiertas. (Nikaido, 2009)

2.11.4.2 BOMBAS DE EXPULSIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA MATE

Las bombas de expulsión pertenecientes a este grupo están compuestas por una sola proteína de membrana, la cual posee 12 dominios transmembranales. En esta familia se ha identificado a la bomba de expulsión AdeM, que es capaz de reconocer un amplio rango de sustratos, tales como norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, gentamicina, 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), triclosán y bromuro de etidio, entre otros. Esta bomba utiliza la fuerza protón-motriz como fuente de energía, a diferencia de otras bombas de la misma familia que utilizan el gradiente de Na^+ . (Nikaido, 2009)

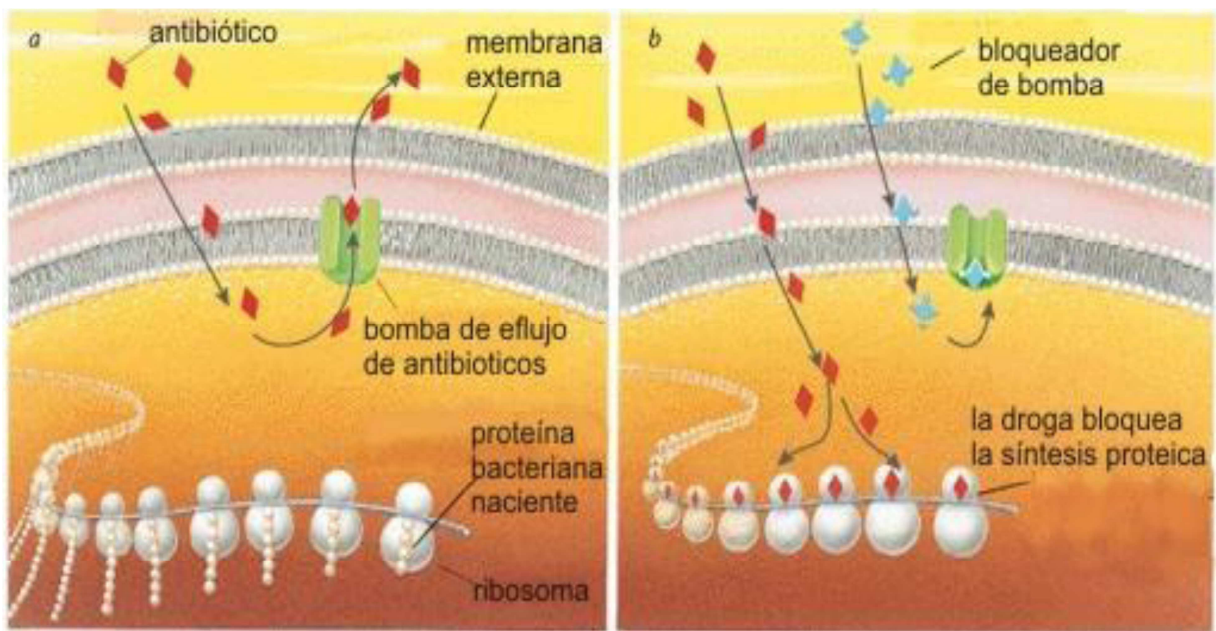


Figura 11. Mecanismo de bombas de expulsión (Machado Reyes, 1998)

2.11.4.3 BOMBAS DE EXPULSIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA RND

De acuerdo a Sánchez y Cols, la mayoría de las bombas de expulsión de bacilos Gram negativos pertenece a la familia RND. (Oliveira D, 2007)

Estas bombas están formadas por tres componentes: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína accesoria periplasmática o proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa o porina.

Los genes que codifican a los distintos componentes de estas bombas de expulsión se encuentran en el cromosoma bacteriano, generalmente en forma de operones.

La importancia de estas bombas de expulsión radica en que poseen un amplio rango de sustratos, por lo que son capaces de contribuir en la resistencia a una gran cantidad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente, y por ello se clasifican como sistemas multifármacos relativamente inespecíficos.

En esta familia aparecen tres proteínas: MexB que actúa como transportador de expulsión en la membrana citoplasmática, MexA es una lipoproteína que actúa como unión de las otras dos y OprM tiene una estructura de porina, que anclada en la membrana externa actúa como canal de expulsión. Las cepas con este operón son resistentes a β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas e inhibidores de beta-lactamasas), fluorquinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas.

Es evidente que las bombas de tipo RND de múltiples fármacos no han aparecido en respuesta al generalizado uso de antibióticos, ya que la mayoría de estas bombas son codificadas por los genes cromosómicos que están presentes en cepas aisladas mucho antes de que el antibiótico apareciera. (Nikaido, 2009)

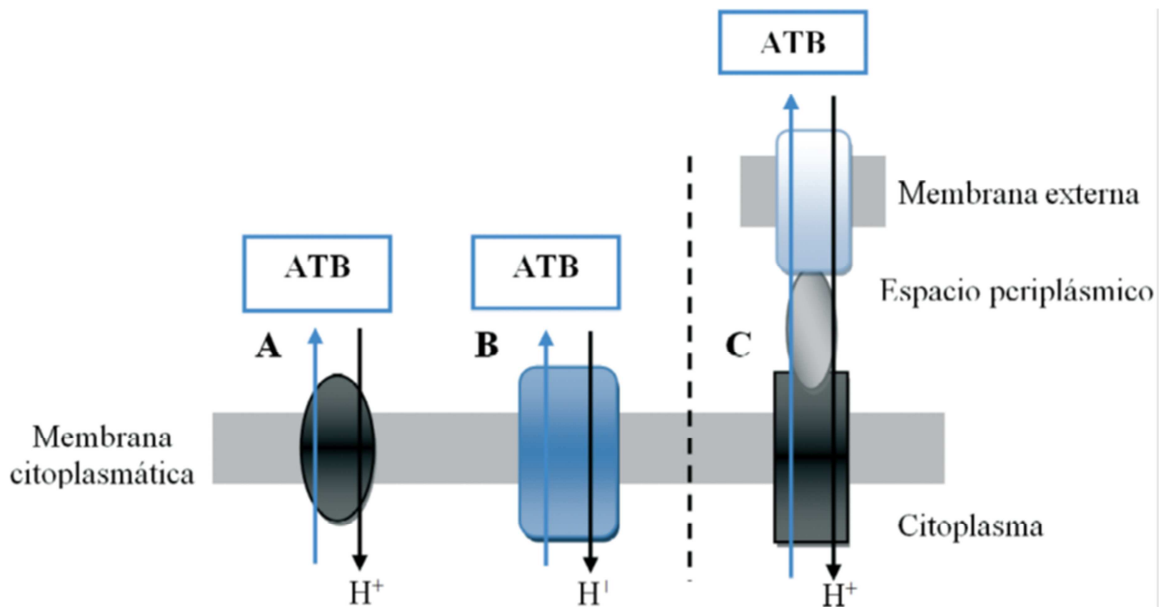


Figura 12. Representación esquemática de las distintas bombas de expulsión involucradas en la multiresistencia en bacterias Gram negativas. (Opazo C., 2009)

Donde:

- A. Bomba de expulsión de la superfamilia MFS.
- B. Bomba de expulsión de la familia MATE.
- C. Bombas de expulsión de la familia RND.

ATB: Antibiótico.

Las bombas de la superfamilia MFS y de la familia MATE están compuestas por una sola proteína de membrana, las cuales mediante un mecanismo antiporte ingresan protones y expulsan moléculas antibióticas. Las bombas de la familia RND están compuestas por tres proteínas distintas: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína de membrana externa o porina, la cual se ubica en la membrana externa y por otra proteína por donde se elimina finalmente el antimicrobiano hacia el medio extracelular. (Nikaido, 2009)

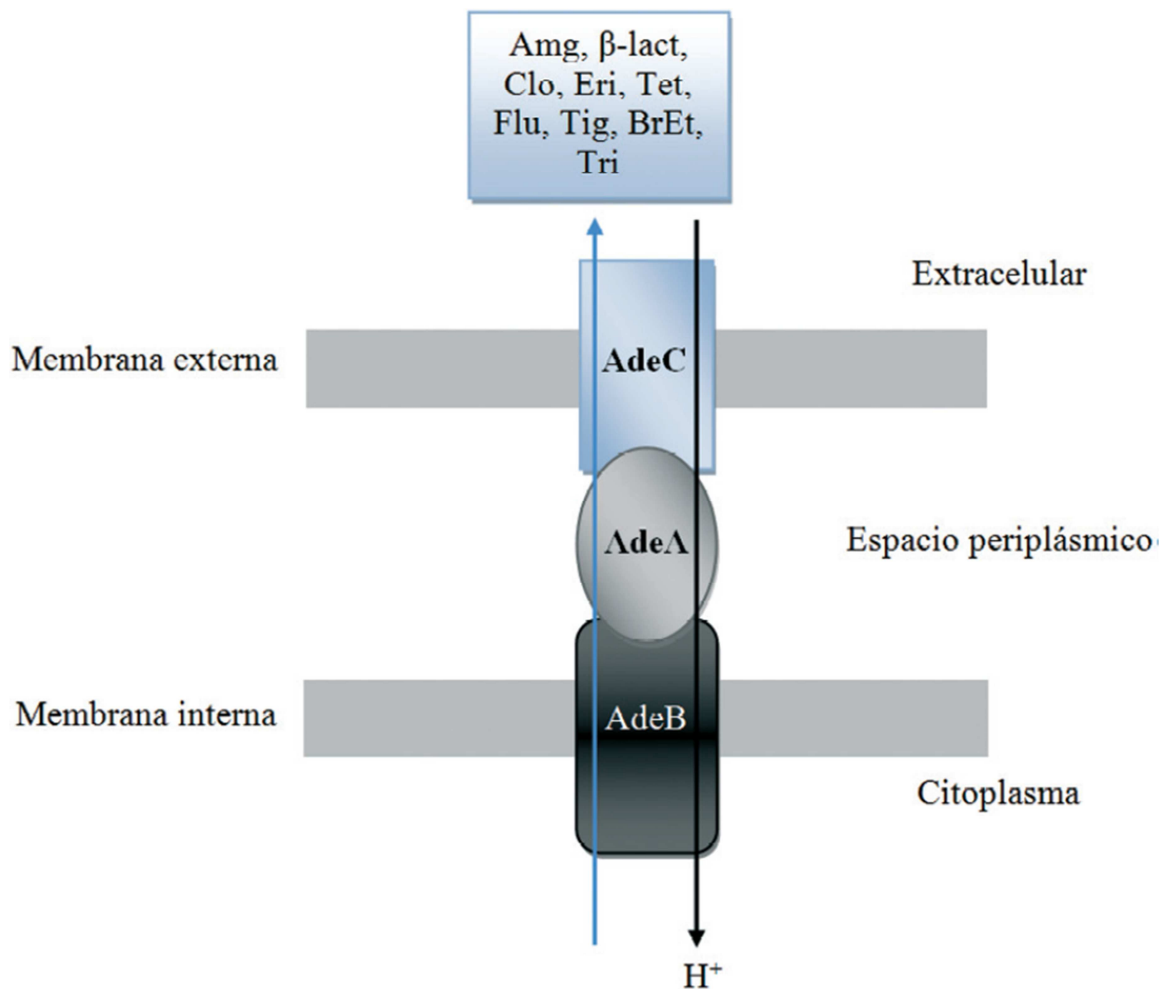


Figura 13. Representación esquemática de la bomba de expulsión AdeABC de bacterias Gram negativas. Amg: aminoglucósidos, β -lact: β -lactámicos, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Tet: tetraciclina, Flu: fluoroquinolonas, Tig: tigeciclina, BrEt: bromuro de etidio, Tri: trimetoprim. La bomba AdeABC se encuentra constituida por la proteína AdeA, la cual corresponde a una proteína de fusión de membrana, AdeB que corresponde a la proteína transportadora multidroga y AdeC que representa a una proteína de membrana externa.

(Opazo C., 2009)

Los distintos antimicrobianos son expulsados desde el interior celular mediante un mecanismo de antiporte en relación con los protones. Este mecanismo de expulsión activa explica una vez más el alto grado de resistencia en los pacientes infectados, sobre todo en las áreas críticas de los hospitales, que se asocian a mayor morbilidad, mortalidad, días de estancia y costos de tratamiento. Es por ello que el Sistema Europeo de Vigilancia de las Resistencias a los Antimicrobianos (EARSS) recomienda además de adecuadas prescripciones, una educación ciudadana, una "cultura antibiótica" de los profesionales hospitalarios, y considera prioritaria la creación de unos sistemas de vigilancia y evaluación del buen uso de los antimicrobianos en el marco de los estados miembros de la Unión Europea. (Tafur, 2008)

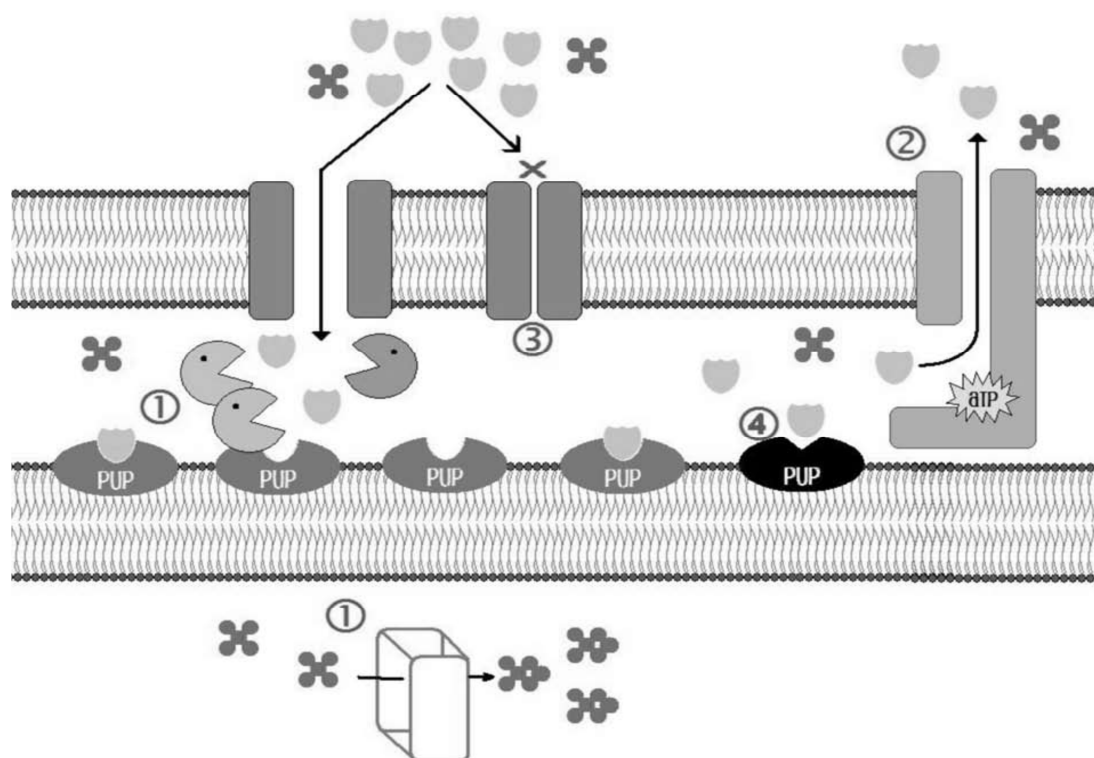


Figura 14. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas unidoras de penicilinas. Proteínas de Unión a Penicilina (PUP). (Tafur, 2008)

2.12 UN PERFIL DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA DE LA PIEL HUMANA

La barrera de la piel es crítica para la supervivencia, impidiendo el escape de la humedad y la invasión por sustancias infecciosas o tóxicas. La piel es también un hábitat complejo para una población diversa de la microbiota. Durante el proceso de parto y posterior exposición al ambiente post-natal, la piel será colonizada por una amplia gama de microorganismos. (Segre, 2006).

La piel está compuesta de una variedad de nichos, incluyendo regiones con un amplio rango de pH, temperatura, humedad y el contenido de grasa. Además, las estructuras de la piel tales como folículos pilosos y glándulas sebáceas, sudoríparas écrinas, y glándulas apócrinas comprenden subhábitats que pueden estar asociados con su propia y única microbiota.

La piel es un potente sistema de análisis microbiológico el cual contiene muchas de las características que nos permiten responder preguntas fundamentales sobre el papel que juegan las diversas comunidades microbianas en la salud y la enfermedad.

Para la investigación médica el NIH ha lanzado recientemente el Proyecto Microbioma Humano (HMP) con la misión integral de caracterizar la microbiota humana y analizar su función en la salud humana y en el estado de la enfermedad. (Marples, 2005)

En su mayoría los microorganismos conocidos que se encuentran en suelos también los podemos encontrar en piel humana sana sobretodo en el espacio que existe entre los dedos de las manos donde viven en armonía con nosotros, ya que existen condiciones propicias para su crecimiento y permanencia. Estas zonas son un desierto bacteriano en comparación con la nariz y el ombligo.

Existen diferentes zonas en el cuerpo que se pueden clasificar por sus condiciones: húmedas, grasosas y secas, aunque también estas condiciones varían en la acidez, la temperatura y la acumulación de sudor lo cual en ocasiones beneficia a algunos microorganismos.

Algunos investigadores sospechan que los cambios en la composición de las comunidades microbianas que se encuentran en la piel pueden activar el sistema inmune provocando enfermedades tal como el eczema. (Pennisi, 2009)

La influencia del uso de las manos constituye un factor importante para la predominancia de diferentes comunidades bacterianas. Esto es debido probablemente a las diferentes condiciones ambientales que existen en la piel, por ejemplo, la producción de grasa, la salinidad y la hidratación o también puede deberse al mayor uso de una mano (mano dominante) con respecto a la de menor uso (mano no dominante). (Marples, 2005)

No ha sido descrita la causa por la cual existen estas diferencias en la diversidad bacteriana, pero se sugiere que las diferencias en el pH de la piel puede ser un factor influyente; por ejemplo los hombres suelen tener una piel más ácida que las mujeres, esto ha demostrado que la diversidad microbiana es a menudo menor en ambientes más ácidos. (Tafur, 2008)

Otra de las explicaciones del por qué los hombres y las mujeres parecen albergar distintas comunidades bacterianas en la piel pueden incluir diferencias en la producción de sudor o grasa, en la frecuencia de aplicación de crema hidratante o la utilización de cosméticos. También se ha confirmado que los hombres y las mujeres albergan distintas comunidades bacterianas, incluso por la forma en la higiene de la piel. (Amoils, 2009)

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible existencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en piel de niños sanos en edad preescolar

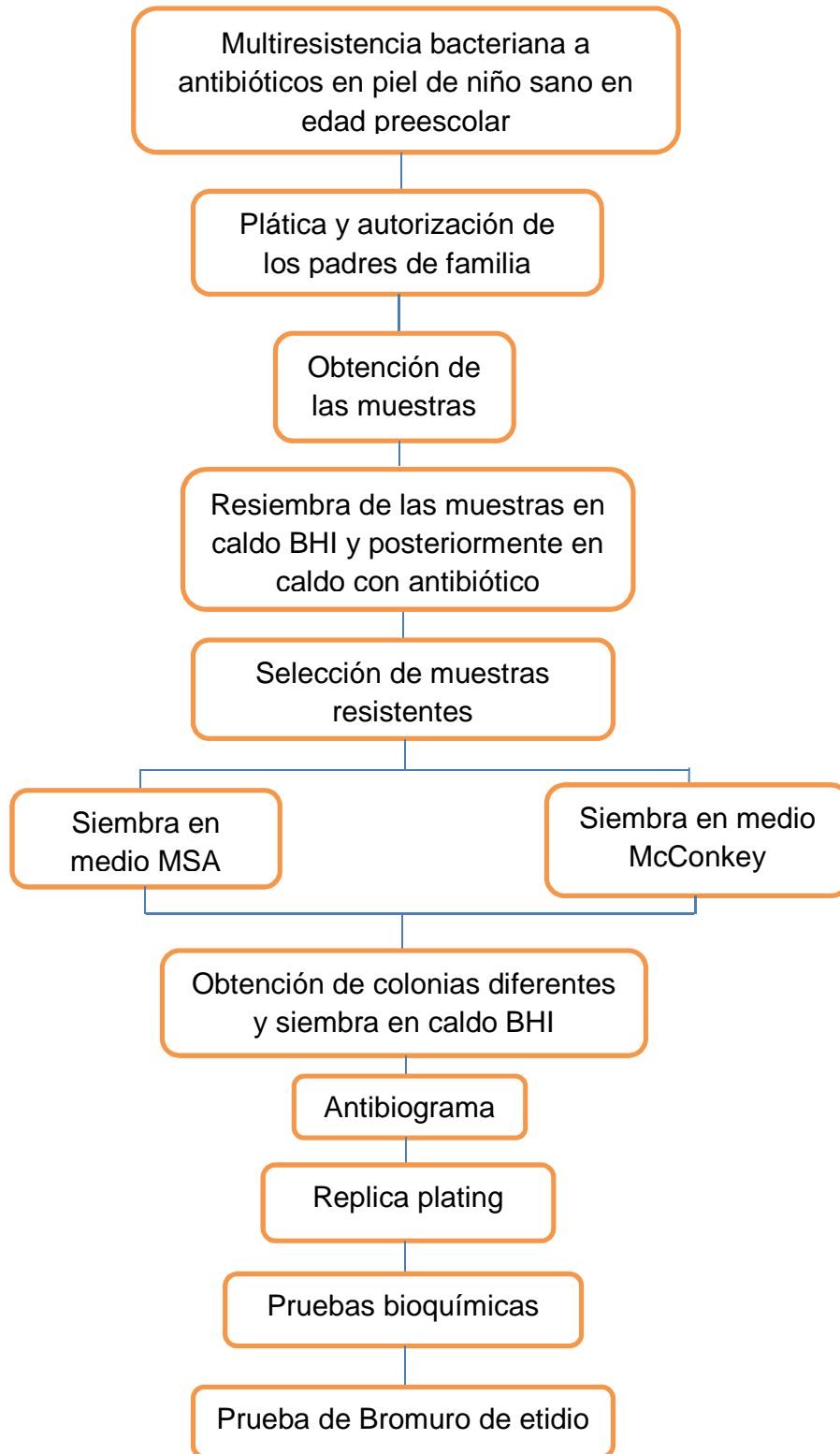
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar diferentes zonas del cuerpo humano que caractericen las diferentes condiciones que existen en la piel: húmeda, seca y grasosa.
- Aislar y caracterizar bacterias multiresistentes a antibióticos provenientes de muestras de piel de niño sano mediante técnica no invasiva.
- Identificar la especie bacteriana que presente el mayor porcentaje de multiresistencia a los antibióticos probados.

4. HIPÓTESIS

Existen bacterias multiresistentes a antibióticos en la piel de niños asintomáticos en edad pre-escolar que no han recibido terapia con antibióticos por lo menos durante los 6 meses previos al estudio.

5. DIAGRAMA DE FLUJO



5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvieron las muestras mediante la realización de un frotis en piel de niños, utilizando un hisopo (estéril, no invasivo), buscando la posible presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos. En este estudio se contó con la participación de 10 niños sanos de nivel preescolar de 4 y 5 años de edad, para esto se realizó una plática con los padres de familia, la cual consistió en solicitar la autorización de los padres para que sus hijos participaran en el estudio, así como también se les explicó en qué consistía este.

Para esto la metodología a seguir fue la siguiente: Se tomó un hisopo estéril y se humedeció en solución salina isotónica al 0.9% también estéril en condiciones asépticas para lo cual se utilizó una lámpara de alcohol y un par de guantes estériles para el muestreo de cada individuo para evitar una posible contaminación de la muestra. Con el hisopo ya humedecido se tomó la muestra a cada niño de las zonas dérmicas antes mencionadas y después dicho hisopo se colocó en un tubo de ensayo de 13x100 con medio estéril, el cual fue caldo BHI.

5.3 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se incubaron las 50 muestras por 24 horas a 37°C. De estas se tomaron 100 microlitros con una micropipeta y en un volumen de 3 mililitros del mismo medio (caldo BHI) se sembraron y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Para la selección de bacterias resistentes a antibióticos, se preparó caldo BHI con antibiótico utilizando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de ellos:

CEFOTAXIMA: 32µg/mL

AMPICILINA: 32µg/mL

DICLOXACILINA: 32µg/mL

CEFTRIAXONA: 64µg/mL

- **Ampicilina:** CMI: 32 $\mu\text{g/mL}$; Marbete: 500 mg/2 mL

$$\frac{500 \text{ mg}}{2 \text{ mL}} = \frac{250 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = 250,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ampicilina}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(250,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ampicilina}) (100 \text{ } \mu\text{L Ampicilina}) = C_2 (1000 \mu\text{L Disolución})$$

$$C_2 = 25,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ampicilina}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(25,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ampicilina}) V_1 = (32 \text{ } \mu\text{g/mL CMI}) (100 \text{ mL caldo BHI})$$

$$V_1 = 0.128 \text{ mL} = 128 \text{ } \mu\text{L Ampicilina}$$

- **Ceftriaxona:** CMI: 64 $\mu\text{g/mL}$; Marbete: 1 g/10ml

$$\frac{1 \text{ g}}{10 \text{ mL}} = \frac{1000 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 100,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ceftriaxona}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(100,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ceftriaxona}) (100 \text{ } \mu\text{L Ceftriaxona}) = C_2 (1000 \mu\text{L Disolución})$$

$$C_2 = 10,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ampicilina}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(10,000 \text{ } \mu\text{g/mL Ceftriaxona}) V_1 = (64 \text{ } \mu\text{g/mL CMI}) (100 \text{ mL caldo BHI})$$

$$V_1 = 0.64 \text{ ml} = 640 \text{ } \mu\text{L Ceftriaxona}$$

- **Dicloxacilina:** CMI: 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Marbete: 250 mg/5 mL

$$\frac{250 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = \frac{50 \text{ mg}}{\text{mL}} = 50,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml} \text{ Dicloxacilina}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(50,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Dicloxacilina}) (100 \text{ } \mu\text{L} \text{ Dicloxacilina}) = C_2 (1000 \mu\text{L} \text{ Disolución})$$

$$C_2 = 5,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Dicloxacilina}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(5,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Dicloxacilina}) V_1 = (32 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ CMI}) (100 \text{ mL} \text{ caldo BHI})$$

$$V_1 = 0.64 \text{ ml} = 640 \text{ } \mu\text{L} \text{ Dicloxacilina}$$

- **Cefotaxima:** CMI: 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Marbete: 1 g/4 mL = 1000 mg/4 mL

$$\frac{1000 \text{ mg}}{4 \text{ mL}} = \frac{250 \text{ mg}}{\text{mL}} = 250,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Cefotaxima}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(250,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Cefotaxima}) (100 \text{ } \mu\text{L} \text{ Cefotaxima}) = C_2 (1000 \mu\text{L} \text{ Disolución})$$

$$C_2 = 25,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Cefotaxima}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(25,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Cefotaxima}) V_1 = (32 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ CMI}) (100 \text{ mL} \text{ caldo BHI})$$

$$V_1 = 0.128 \text{ mL} = 128 \text{ } \mu\text{L} \text{ Cefotaxima}$$

Una vez preparado el caldo con antibiótico se colocaron 3 mL de este en tubos de ensaye de 13x100 mas 100 μL de muestra (esto se realizo para cada una de las muestras) posteriormente, se incubaron las 50 muestras de cada antibiótico por 24 horas a 37°C, (teniendo un total de 200 tubos).

5.3.1 SIEMBRA EN MEDIO MSA Y McConkey

Se procedió a la observación de las muestras y se eligieron solo aquellas en las que existía buen crecimiento por lo que se procedió a la preparación de medios de cultivo diferenciales MSA y McConkey para poder aislar los dos diferentes grupos (Gram positivos y Gram negativos), se sembró utilizando la técnica de estría radial en busca de diferentes tipos de colonias y se incubaron las cajas por 24 a 48 h a 37°C.

Al finalizar la incubación, en algunas de ellas había hasta 3 tipos de colonias diferentes en cuanto a su tamaño y morfología; en otras se observó que existió vire del medio. Una vez realizando estas observaciones se procedió a realizar tinción de Gram de cada una de las diferentes colonias de cada caja para corroborar si el cultivo se encontraba puro, al observar al microscopio con el objetivo de 100x se pudo observar que existían casos en los que sí se encontraba puro, pero existieron casos en los que no, por lo que se realizó nuevamente la resiembra en caldo BHI para su posterior resiembra en medios MSA y McConkey en esos casos se realizó nuevamente la tinción de Gram y su posterior observación al microscopio; esta vez se consiguió obtener todas las muestras puras.

Al tener las muestras en su totalidad puras se sembraron nuevamente en tubos con caldo BHI para su posterior incubación por 24 h a 37°C

5.3.2 ANTIBIOGRAMA

El siguiente paso fue realizar la técnica de antibiograma con el fin de conocer si existía multiresistencia a antibióticos por lo que se preparó agar Mueller Hinton y la selección de sensidiscos que contenían 15 antibióticos diferentes para todas las muestras. Se realizó el extendido en placa de la cepa utilizando una varilla de vidrio esterilizada con alcohol y la posterior colocación del sensidisco, de la misma forma se siguió el procedimiento ya mencionado de incubación (24 h a 37°C).

Posteriormente se registró si presentaban o no halo de inhibición, de estos resultados se seleccionaron las cepas que presentaban multiresistencia para realizar la siguiente prueba.

5.3.3 REPLICA PLATING

Esta técnica consistió en tomar 1µL de cepa e inocularlo en 10mL de solución salina isotónica (SSI), mezclarlo con la ayuda de un vórtex para poder realizar la técnica llamada replica plating, la cual consiste en preparar cajas estériles con agar Mueller Hinton para la posterior siembra por extendido en placa con ayuda de una varilla de vidrio previamente esterilizada con alcohol, una vez sembrada la cepa se incubó por 24 h a 37 °C.

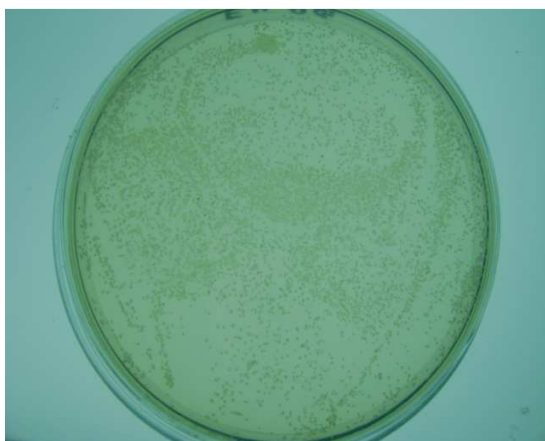


Figura 14. Incubación de 24 h a 37°C en agar Mueller Hinton sin antibiótico.



Figura 15. Replica plating

Se preparó el doble número de cajas utilizadas de agar Mueller Hinton pero ahora fueron divididas en dos grupos con su respectivo antibiótico:

- Grupo 1: antibiótico utilizado: ampicilina
- Grupo 2: antibiótico utilizado: ceftriaxona

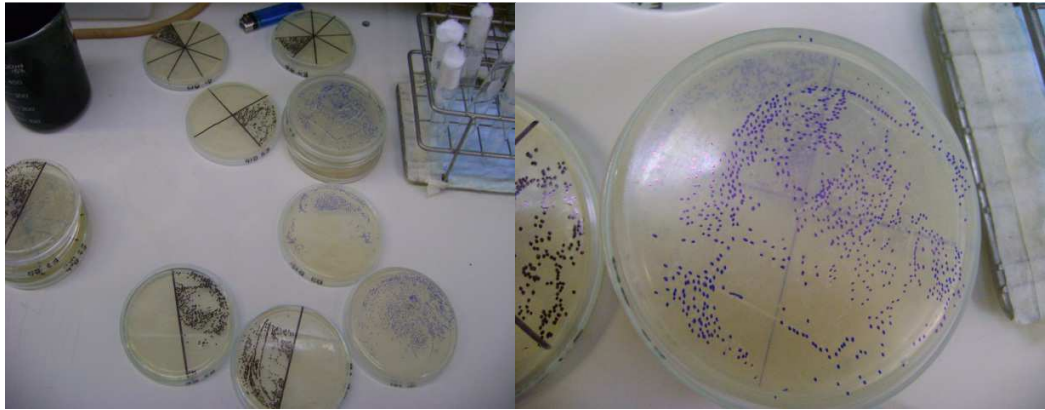


Figura 16 y 17. Cuantificación de colonias por el método de conteo dilución en placa.

Después de 24 h de incubación se contaron las colonias de cada caja por el método de conteo dilución en placa; posteriormente, con ayuda de paños de terciopelo previamente esterilizados, se procedió a colocar uno para cada caja en zona estéril con ayuda de un mechero bunsen. Dentro de esta área se extendió el paño de terciopelo sobre una base cilíndrica de madera e inmediatamente se sujetó a ella con una abrazadera de acero inoxidable con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas. La caja con las colonias ya contadas se colocó sobre el terciopelo oprimiéndola solo un poco, buscando que dichas colonias se adhirieran al terciopelo utilizando a éste como un conjunto de alfileres tratando de agarrar el mayor número de colonias posible para su posterior transferencia a las cajas con antibiótico, siguiendo el mismo procedimiento para su posterior incubación y contabilización para así obtener un porcentaje de resistencia para cada antibiótico.

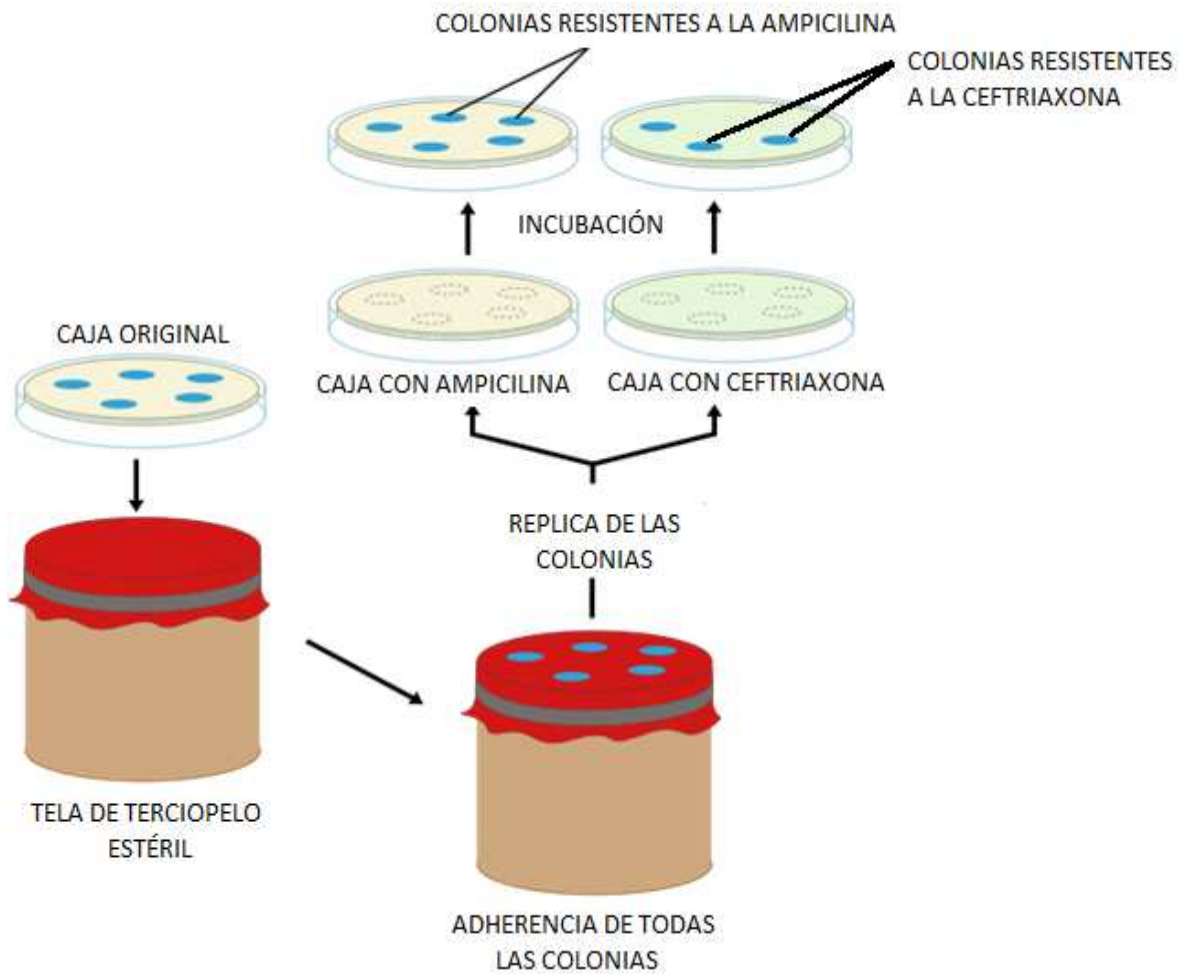


Figura 18. Esquema de procedimiento de la técnica replica plating.

5.3.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Siguiendo con el estudio de identificación y caracterización de bacterias multiresistentes se realizaron pruebas bioquímicas como prueba de la catalasa y la prueba de la coagulasa para el grupo Gram positivo y la prueba de la oxidasa y la preparación de los siguientes medios para el grupo Gram negativo: KIA, CITRATO DE SIMMONS, SIM, VP, MIO, OF, las cepas fueron sembradas para su posterior incubación por 24 h a 37°C, una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la interpretación de las mismas.

5.3.5 BROMURO DE ETIDIO

El bromuro de etidio es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Este efecto es debido al aumento de la hidrofobia del medio, y no a la rigidez del anillo bencénico, no estando éste entre pares de bases del ADN. Como el bromuro de etidio se intercala en el ADN, esta sustancia tiene un poderoso efecto mutágeno.

La mayor parte de la molécula es una estructura tricíclica con grupos aminobenceno en cada lado de una molécula piridina (seis átomos, conteniendo nitrógeno y un anillo aromático). Esta estructura dibenzopiridínica es conocida con el nombre de fenantridina.

Siguiendo con el protocolo se realizó una prueba con bromuro de etidio utilizando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de este, utilizando cepas que abarcaran las diferentes zonas de la piel de niño muestreadas y que presentaran bacterias con la mayor multiresistencia a antibióticos (de 7 a 9).

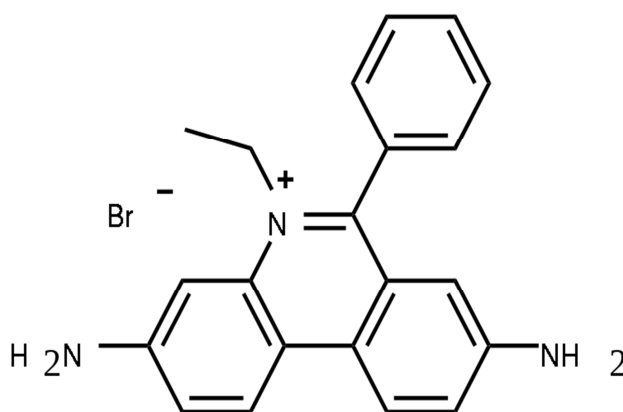


Figura 19. Estructura química del bromuro de etidio. (FEUM, 2008)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la multiresistencia bacteriana que existe en piel de niño en edad preescolar. Se contó con la participación de 10 voluntarios sanos de un jardín de niños cuyas edades oscilaban entre 4-5 años, por lo que se realizó una plática con los padres de familia, solicitando su autorización para que sus hijos participaran en el estudio así como también se les explicó en qué consistía éste.

Una vez obtenida la autorización se procedió al llenado de un cuestionario el cual se presenta a continuación:

6.1 CUESTIONARIO

(FORMATO):

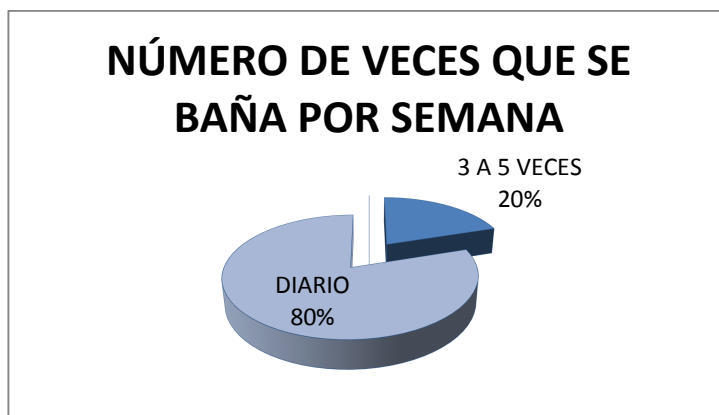
NOMBRE:

EDAD:

- ¿Cuántas veces a la semana se baña?
- ¿Se baña en la mañana, tarde o en la noche?
- ¿Cada cuando se limpia los oídos y el ombligo?
- ¿Siempre se lava las manos antes de comer y después de ir al baño?
- ¿Con qué frecuencia come el niño en la calle?
- ¿Con cuantas personas convive?
- Las personas con las que convive ¿Qué edad tienen?
- ¿Tiene mascotas? (tipo de mascota)

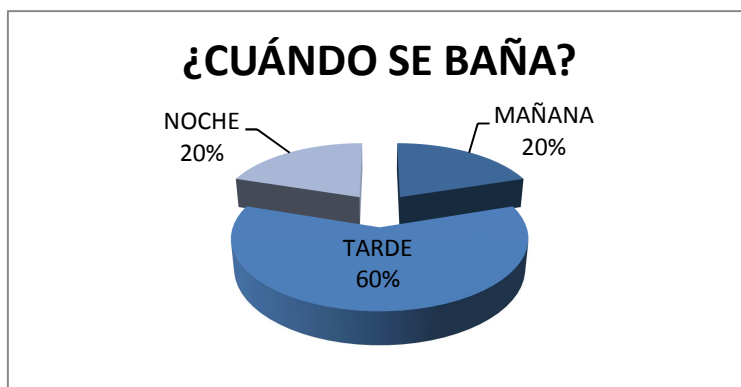
A continuación se presenta la estadística obtenida del cuestionario:

1. Número de veces que se baña por semana.



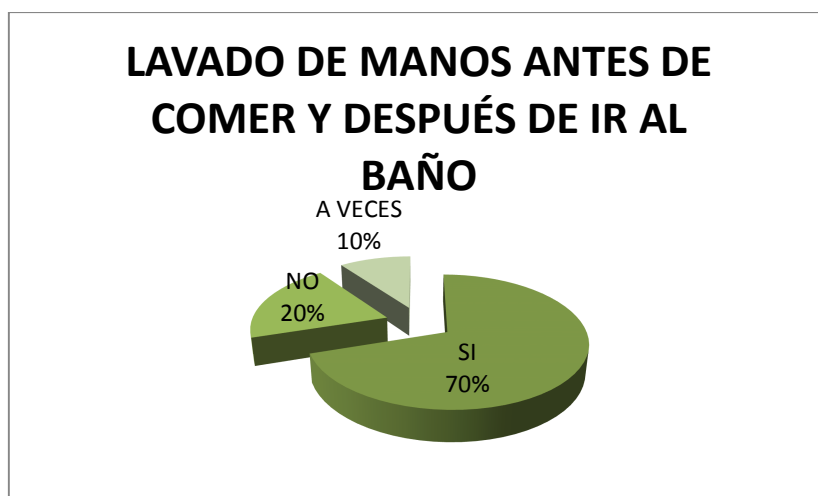
Consideramos que es una pregunta fundamental en el estudio ya que fue un primer acercamiento que brinda una idea para identificar posibles interferencias y hábitos comunes en la población muestreada, pero afortunadamente al realizar el estudio se confirmó dicho resultado (niños muestreados en realidad en su mayoría se encontraban limpios).

2. ¿En qué momento del día se baña?



Esta pregunta fue formulada con la idea de aportar datos sobre la estadía promedio del microorganismo en la piel antes de disminuir la carga microbiana con el baño. Con los datos arrojados puedo suponer que al momento de muestrear la mayoría de los niños se encontraban en un estadio cercano a su remoción habitual debido la toma del baño.

3. Lavado de las manos antes de comer y después de ir al baño



Esta pregunta tuvo la finalidad de saber un poco más sobre los hábitos de higiene que comúnmente tienen, para determinar si presentaban una posible invasión de microorganismos no residentes de la biota normal de esa zona.

4. Frecuencia con la que se asea los oídos y el ombligo



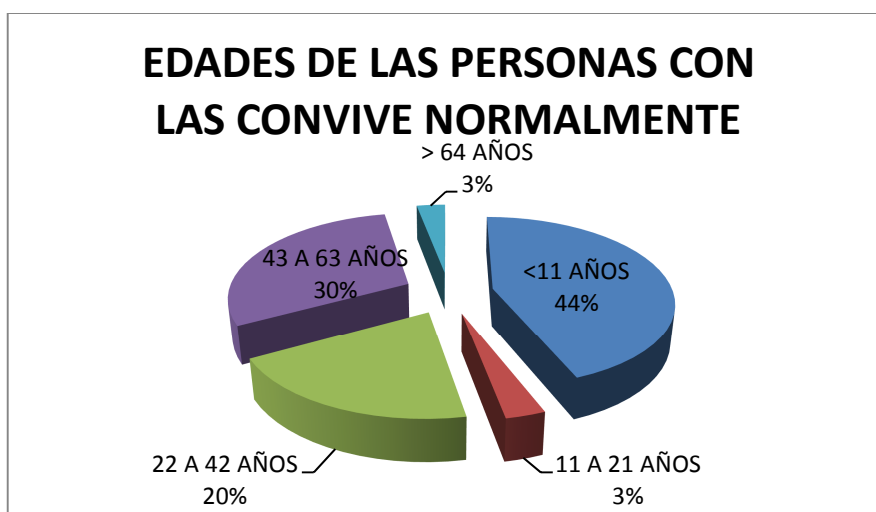
Esta pregunta fue formulada ya que en particular al principio del estudio se suponía que en estas dos zonas muestreadas se encontraría mayor población de microorganismos y su posible resistencia por las condiciones de secreción corporal que presentan estas zonas habituales (sudor, grasa) y de la misma forma saber con qué frecuencia son aseadas.

5. ¿Con cuántas personas convive en casa?



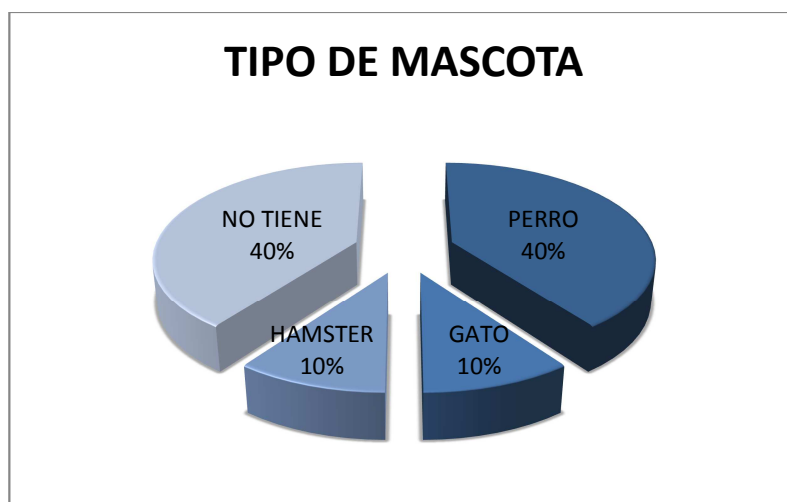
Esta pregunta fue realizada con el propósito de conocer el número de contactos humanos promedio que tienen, con el fin de proporcionar una idea acerca de la diversidad microbiana que presentarían los niños.

6. ¿De qué edades son las personas con las que convive?



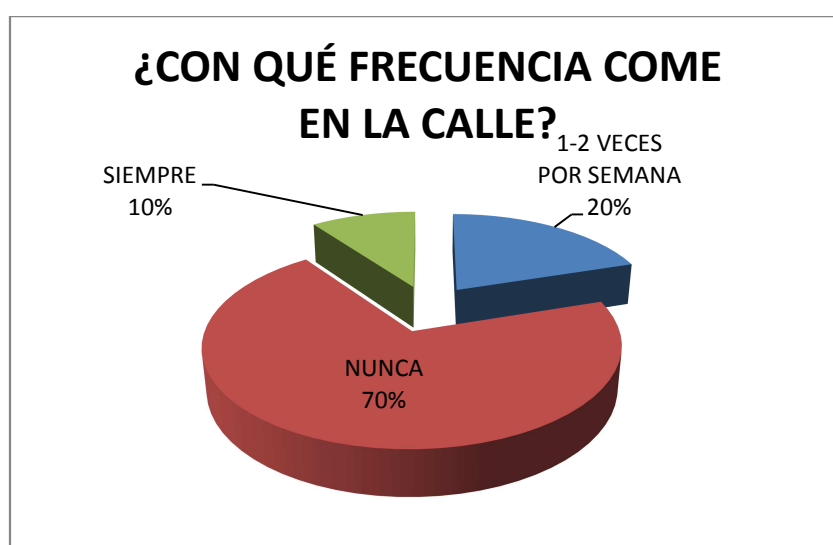
Esta pregunta puede ser útil para saber de posibles interacciones con microbiota perteneciente a otra edad y una posible transferencia de multiresistencia como ya se ha reportado en artículos científicos.

7. Tipo de mascota que tiene en el hogar



Esta pregunta nos podría brindar un conocimiento de su posible convivencia con microorganismos pertenecientes a la biota encontrada en la piel de los niños, pero al estudiar la gráfica y una vez corroborando con las muestras se pudo observar que las bacterias que presentaron mayor porcentaje de multiresistencia eran aquellas que pertenecían a niños que no tenían mascotas ya que existe un 40% de niños muestreados que no tienen mascota en casa por lo que es poco probable que las bacterias multiresistentes provinieran de animales.

8. ¿Con qué frecuencia como en la calle?



Esta pregunta se elaboró para conocer con qué frecuencia presentaban infecciones gastrointestinales, ya que los padres referían que las pocas veces que comían en la calle sus hijos solían enfermarse por lo que los médicos les recetaban antibióticos.

Con todas estas respuestas obtenidas se puede observar que el problema de multiresistencia puede provenir de diversas causas, por lo que se convierte en un problema multifactorial de salud pública.

6.2 RESISTENCIA BACTERIANA A CUATRO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Resultados obtenidos de la toma de muestra con los cuatro antibióticos probados para la selección de las muestras resistentes:

Tabla 3. Resistencia bacteriana a cuatro diferentes antibióticos

MUESTRA	CEFOTAXIMA	CEFTRIAXONA	DICLOXACILINA	AMPICILINA
A1	+	-	-	-
B1	-	-	+	+
C1	-	-	-	-
D1	-	-	-	+
E1	+	+	-	+
A2	+	-	+	+
B2	+	-	-	-
C2	+	-	+	+
D2	+	+	-	-
E2	-	-	+	+
A3	-	-	-	-
B3	-	+	+	+
C3	-	-	-	+
D3	-	-	-	+
E3	+	-	-	+
A4	-	-	-	-
B4	-	-	-	+
C4	-	+	-	+
D4	-	-	+	-
E4	+	+	-	-
A5	+	+	-	+
B5	-	+	+	+
C5	-	-	-	+

D5	-	+	-	+
E5	+	+	-	+
A6	+	+	+	+
B6	+	-	-	+
C6	+	-	+	+
D6	+	-	-	+
E6	-	-	+	+
A7	-	-	-	-
B7	-	-	+	-
C7	-	-	-	+
D7	-	-	-	+
E7	+	-	-	-
A8	-	+	-	-
B8	-	+	-	+
C8	-	-	-	+
D8	-	+	+	+
E8	+	-	-	+
A9	-	-	-	+
B9	+	-	+	+
C9	+	-	-	+
D9	-	-	-	+
E9	-	-	-	+
A10	+	-	+	-
B10	-	-	-	-
C10	-	-	+	-
D10	+	-	-	-
E10	-	-	+	-

NOTA: + presencia de crecimiento, - ausencia de crecimiento

6.3 PORCENTAJE DE RESISTENCIA BACTERIANA POR ZONAS DE LAS MUESTRAS TOTALES

Tabla 4. Porcentaje de resistencia bacteriana por zona de las 10 muestras totales.

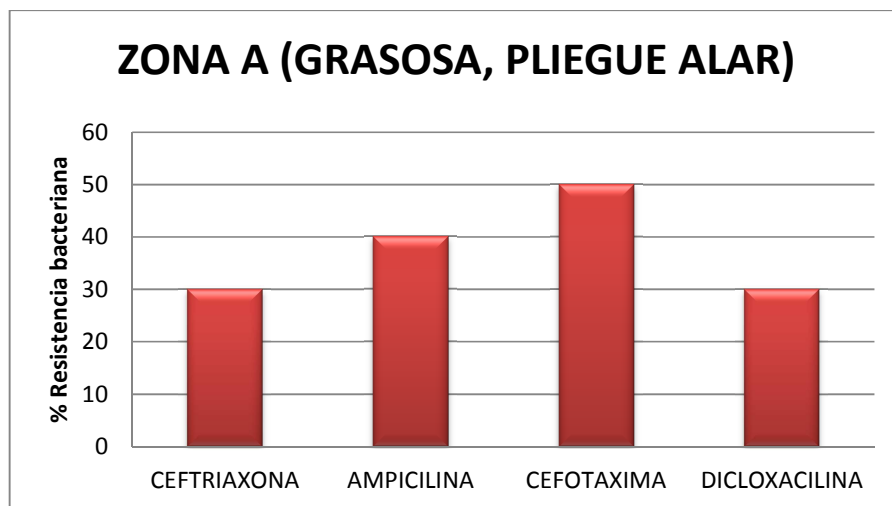
Al calcular los porcentajes de bacterias resistentes a los cuatro diferentes antibióticos de las muestras totales obtenidas para cada una de las zonas muestreadas se observó lo siguiente:

ZONA	CEFTRIAXONA	AMPICILINA	CEFOTAXIMA	DICLOXACILINA
A	30.0%	40.0%	50.0%	30.0%
B	30.0%	70.0%	30.0%	50.0%
C	10.0%	80.0%	30.0%	30.0%
D	30.0%	70.0%	30.0%	20.0%
E	20.0%	70.0%	60.0%	30.0%

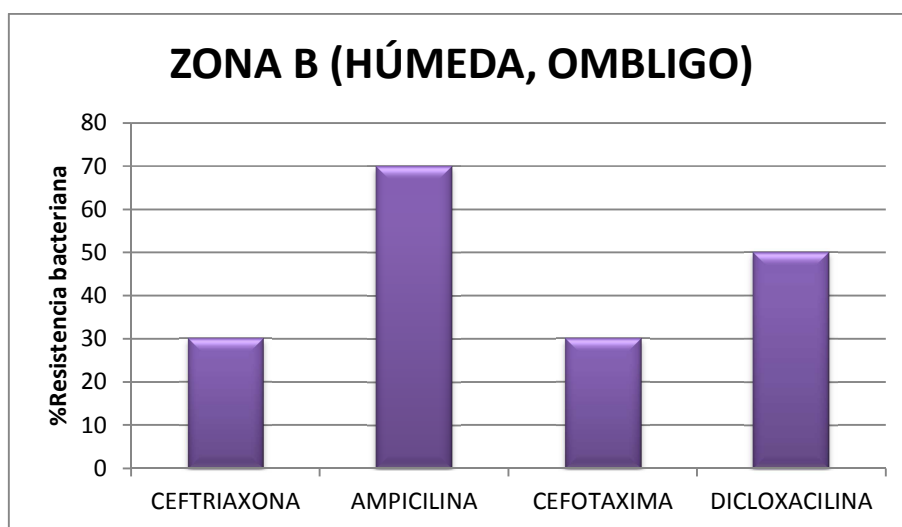
Pliegue alar (zona A, grasosa), Ombligo (zona B, húmeda), Espacio interdigital (zona C, seca), Fosa poplítea (zona D, seca) y Conducto auricular externo (zona E, grasosa)

6.4 GRÁFICAS PERTENECIENTES AL PORCENTAJE DE RESISTENCIA BACTERIANA POR ZONAS

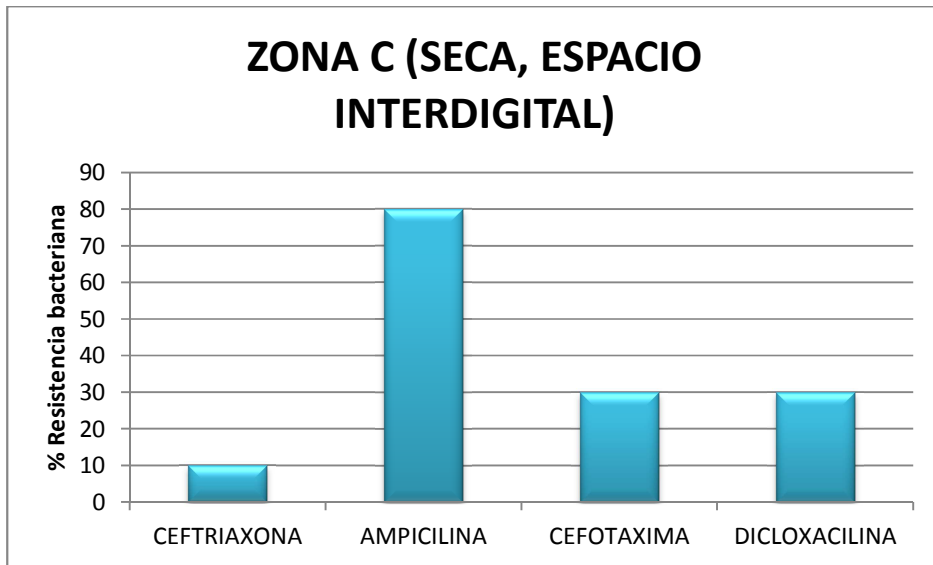
Al realizar estudios estadísticos de los porcentajes de bacterias resistentes a los cuatro diferentes antibióticos de las muestras totales obtenidas para cada una de las zonas muestreadas se observó lo siguiente:



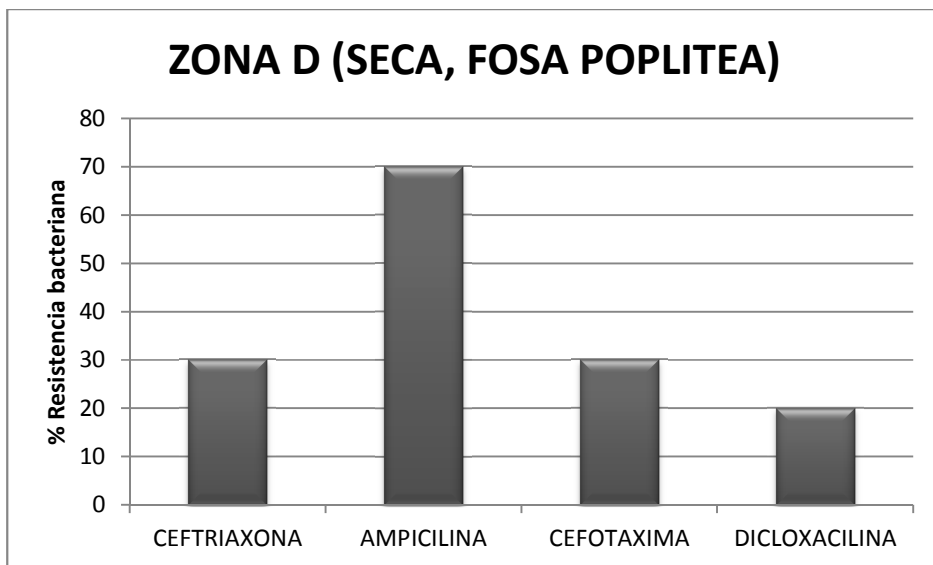
En el pliegue alar se encontró mayor porcentaje de resistencia a la cefotaxima (50%)



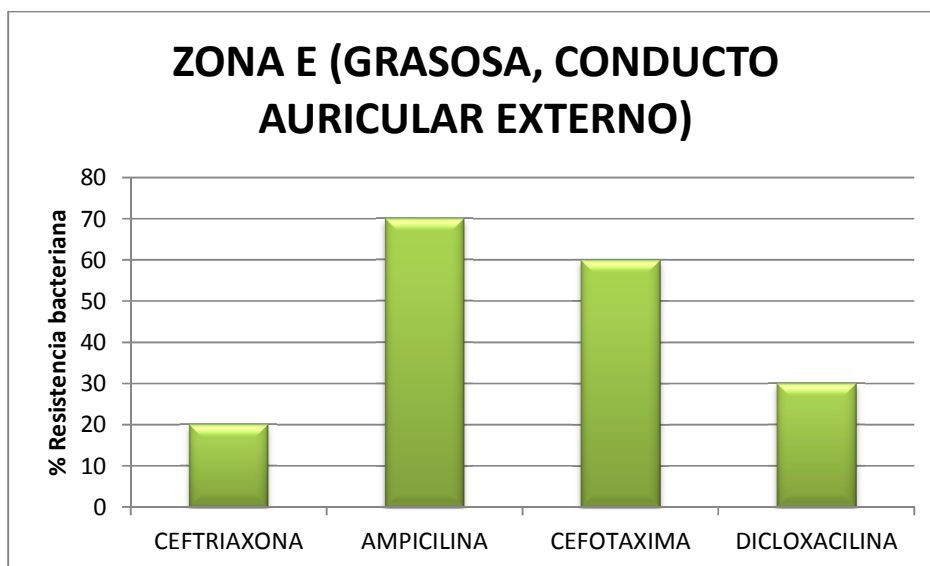
En el ombligo se encontró mayor porcentaje de resistencia a la ampicilina (70%)



En el espacio interdigital se encontró un mayor porcentaje de resistencia a la ampicilina (80%)

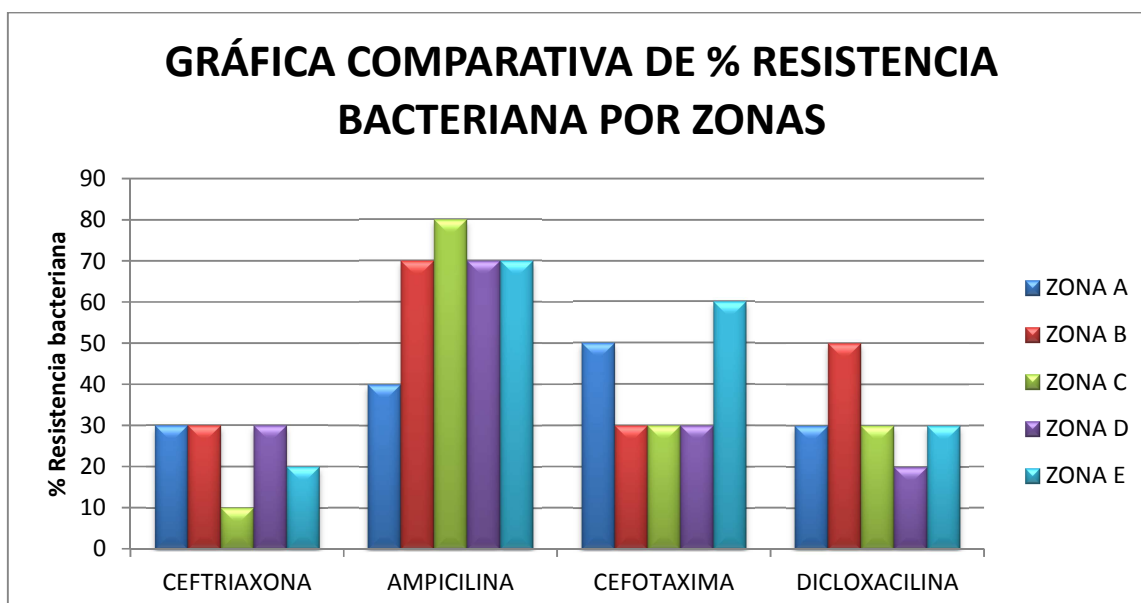


Para la fosa poplítea se encontró un mayor porcentaje de resistencia a la ampicilina (70%)



En el pabellón auricular se encontró un mayor porcentaje de resistencia a la ampicilina (70%)

Nota: Debe recordarse que los antibióticos se evaluaron individualmente por cada una de las zonas estudiadas y no en conjunto por lo que la sumatoria de los porcentajes no nos brinda el 100%, ya que una misma bacteria puede ser resistente a más de un antibiótico.



6.5 PRESENCIA RELATIVA DE RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS PROBADOS



6.6 ANTIBIOGRAMAS

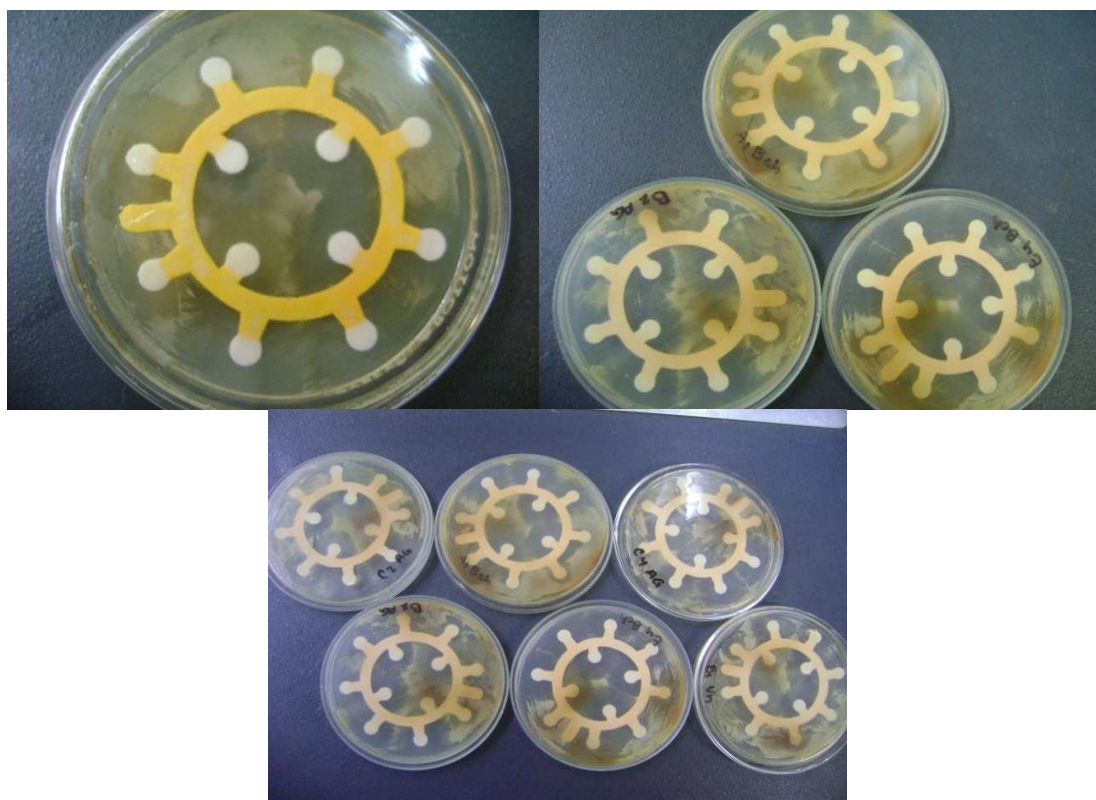
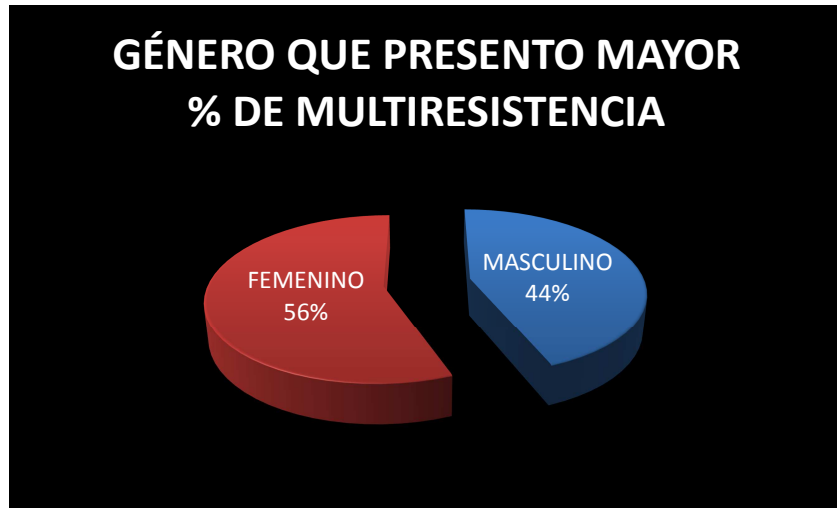


Figura 20. Resistencia bacteriana a diferentes antibióticos.

DISTRIBUCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN FUNCIÓN DEL GÉNERO



Como se observa en la gráfica, el género femenino presentó mayor porcentaje de multiresistencia bacteriana como se ha reportado en la literatura.

6.7 REPLICA PLATING

Con el objeto de conocer la frecuencia relativa de bacterias resistentes a antibióticos en la población general de bacterias cultivables presentes en la piel de individuos normales asintomáticos, se llevó a cabo la replicación de la población frente a 2 antibióticos. Para esta técnica se utilizaron dos antibióticos los cuales se seleccionaron dependiendo de la frecuencia de resistencia observada; es decir, se escogió el antibiótico que presentó mayor porcentaje de resistencia (ampicilina) y el de menor porcentaje de resistencia (ceftriaxona).

Tabla 5. Fracción de la población total de colonias multiresistentes a los antibióticos probados.

CEPA	AMPICILINA	CEFTRIAXONA
A1BCH	93.90%	91.10%
A1AM	62.80%	1.30%
B1	65%	67.80%
D1AG	88.70%	52.50%
D1BCH	81.40%	32.30%
E1	93.60%	28.40%
A2BM	44.80%	64.90%
A2AG	76.20%	45.10%
B2AG	66.20%	73.70%
B2BCH	98.50%	55.50%
C2AG	62.30%	14.70%
C2BM	95.20%	47.30%
D2	93.10%	54.80%
E2AG	89.40%	22.40%
E2BCH	83.50%	44.90%
B3	93.50%	56.30%
C3	95.40%	34.90%
D3AG	88.10%	67.80%
D3BM	80.40%	76.10%
D3CCH	76.30%	88.40%
E3AG	34.30%	2.20%
E3BCH	44.80%	10.60%
B4	65.90%	52.50%
C4AG	33.30%	18.80%
C4BCH	82.90%	21.30%

D4AG	23.90%	6.20%
D4BCH	38.20%	15.10%
E4AG	94.90%	67.40%
E4BCH	34.70%	10.30%
A5	82.30%	75.30%
B5	96.60%	87.10%
C5AG	33.50%	29.20%
C5BCH	97.60%	69.10%
D5	82.00%	49.00%
E5AG	98.30%	79.10%
E5BCH	98.80%	72.20%
A6	49.50%	90.60%
B6	55.20%	95.70%
C6	97.00%	70.60%
D6AG	92.60%	63.10%
D6BM	95.70%	69.50%
E6	88.30%	4.00%
B7AG	98.30%	54.80%
B7BCH	71.30%	32.40%
C7	46.10%	22.60%
D7	90.10%	39.40%
E7	55.70%	17.50%
A8AG	78.60%	25.30%
A8BM	89.20%	37.40%
A8CCH	77.40%	26.60%
B8	91.20%	88.40%
C8AG	71.60%	98.10%
C8BCH	53.10%	37.00%
D8	76.10%	90.40%

E8	79.50%	21.80%
A9	99.70%	95.90%
B9	85.70%	86.30%
C9	91.90%	34.30%
D9AG	80.90%	98.80%
D9BCH	92.30%	99.60%
E9	87.40%	92.70%
A10	95.70%	54.90%
C10	85.40%	52.70%
D10AG	88.10%	37.60%
D10BCH	95.50%	50.80%
E10	66.60%	98.90%

	AMPICILINA	CEFTRIAXONA
Media	77.21%	52.63%
D.E.	20.39%	29.05%
%CV	26.40%	55.19%

Descripción de las colonias en cuanto a tamaño:

G: colonia grande M: colonia mediana CH: colonia chica

Con esta técnica se observó un mayor porcentaje de resistencia a la ampicilina como ya se había notado en las muestras iniciales.

Gram positivos

Se observó que la familia que presentó el mayor porcentaje de multiresistencia bacteriana a los antibióticos fue *Micrococcaceae* en particular el género *Staphylococcus* fue el que predominó, siendo *Staphylococcus coagulasa positivo* la que se presentó en un 69.7%, seguida de *Staphylococcus sp.* con un 10.6%, de la familia *Streptococcaceae* el género *Streptococcus sp.* se presentó en un 7.6%.

Gram negativos

De la familia *Enterobacteriaceae* el género *Pseudomonas* en especial la especie *Pseudomonas aeruginosa* se presentó en un 12.1%.

6.8 ESTUDIOS CON BROMURO DE ETIDIO

Para esta prueba se seleccionaron algunas de las cepas que presentaron mayor multiresistencia (de 7 a 9 antibióticos diferentes). Como segundo criterio se seleccionaron con base a que cada cepa representara una zona del cuerpo estudiada y como último criterio se escogieron con base a los géneros obtenidos.

Estas cepas se expusieron a diferentes concentraciones de bromuro de etidio para determinar una posible sobreexpresión de bombas de expulsión ya que comúnmente las bacterias no sobreviven a tan altas concentraciones de este compuesto, lo cual si ocurrió, esto sugiere que está ocurriendo una expresión aumentada de estas bombas de expulsión localizadas en la membranas de las bacterias.

Tabla 6. Prueba del bromuro de etidio

CEPA	CONCENTRACIÓN DE BROMURO DE ETIDIO PROBADAS ($\mu\text{g/ml}$)											
B2AG	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300
D4AG	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300
B6	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300
E8	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300
A9	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300
C9	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300

Nota: Valores en rojo indican las concentraciones máximas de bromuro de etidio a la cual las bacterias aun crecían.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE BROMURO DE ETIDIO A LA CUAL SOBREVIVIERON LAS CEPAS MULTIRESISTENTES

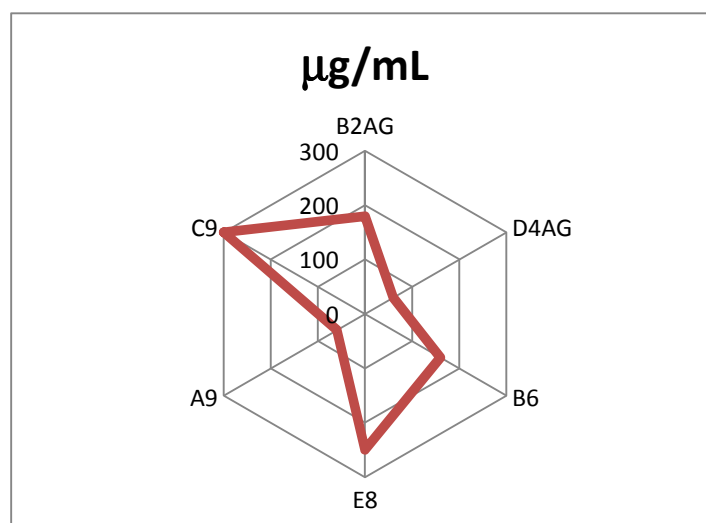


Figura 21. De las 6 cepas seleccionadas 4 de ellas se encontraron por debajo de la concentración de $200\mu\text{g/mL}$ y dos de ellas se encontraron por encima de ésta (E8: $250\mu\text{g/mL}$ y C9: $300\mu\text{g/mL}$) las cuales pertenecen a conducto auricular externo y espacio interdigital respectivamente.

7. CONCLUSIONES

El uso irracional de los antibióticos y la falta de conocimiento de los mecanismos de resistencia de las bacterias han llevado a una disminución acentuada de las opciones terapéuticas en los hospitales y en la comunidad. Debido a la falta de nuevos antibióticos capaces de vencer estos mecanismos de resistencia, el desarrollo de campañas educativas y protocolos encaminados a orientar el adecuado uso de antibióticos es muy importante para preservar los pocos antibióticos que no presentan disminución de efectividad farmacológica. Cuando se revisa la literatura disponible se encuentra cómo la resistencia de microorganismos a los antibióticos se trata de un problema progresivo con tendencia a empeorar si no se toman medidas al respecto.

Uno de los mecanismos más efectivos consiste en la instauración de formularios de antibióticos que restringen el uso de los mismos autorizando el uso de un fármaco de cada clase disponible. Esto permite que el personal se familiarice con un número limitado de fármacos con lo cual es más fácil conocer sus características farmacológicas y sus efectos secundarios, pero lo más importante es que permite que se tenga la opción de suspender temporalmente el fármaco o cambiarlo por otro de acción similar cuando la biota intrahospitalaria muestre resistencia a ese determinado agente.

En este estudio se logró determinar que los niños a muy temprana edad ya presentan bacterias multiresistentes a antibióticos lo cual causa un grave problema de salud pública, porque para este estudio se seleccionaron antibióticos que desde hace aproximadamente 20 años están inscritos en el cuadro básico del sector salud y a esto se suma el mal diagnóstico que realizan los médicos debido a que la mayoría de las veces no mandan realizar los estudios de laboratorio pertinentes tratando de solucionar el problema recetando antibióticos de amplio espectro causando muchas veces un problema mayor al eliminar la microbiota normal que es benéfica para el cuerpo humano. (Plascencia, 2005)

Al presentarse esta multiresistencia a estas edades puede correrse el riesgo de que en la edad adulta, para poder controlar posibles infecciones bacterianas, se tendría que recurrir a dosis cercanas a las tóxicas lo cual ocasiona un grave peligro para la vida del paciente. Sin embargo, se observa que aun no se ha entendido bien el concepto de que no siempre a mayor dosis mayor será el efecto deseado.

El laboratorio juega un papel importante al momento de reportar casos de resistencia que se presenten contra los fármacos que se están aplicando en determinado momento en el hospital, ya que permite la detección precoz de cepas resistentes que pueden controlarse con oportunos cambios en los antibióticos autorizados para uso en la institución.

Otro aspecto fundamental del laboratorio es tipificar los microorganismos en el menor tiempo posible dando además su perfil de susceptibilidad para pasar de la terapia empírica a la específica con el antibiótico indicado para el microorganismo identificado. El antibiótico debe elegirse teniendo en cuenta que sea no sólo específico y también debe buscarse un fármaco económico.

También hay problemas prácticos en cuanto a la prevención del incremento de bacterias resistentes a múltiples fármacos, esto conlleva a reducir al mínimo el uso de antibióticos. De hecho, existe una correlación sorprendente entre el uso de β -lactámicos y la frecuencia de aparición de cepas resistentes a la penicilina como los neumococos en los países miembros de la Unión Europea. (Plascencia, 2005)

Con lo que respecta a las bacterias, estas poseen diversos mecanismos de resistencia a antimicrobianos, tales como producción de enzimas, pérdida de porinas, alteración de moléculas blanco y expulsión de antimicrobianos.

En los últimos años, el mecanismo de expulsión ha incrementado considerablemente su importancia, ya que el número de cepas multiresistentes a antimicrobianos que lo poseen ha aumentado en todo el mundo. Debido a esto, es necesario un mayor conocimiento de este mecanismo, sobre todo por la capacidad que poseen dichos sistemas de expulsar una gran variedad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente.

Los inhibidores de bombas de expulsión pueden ser una alternativa de gran importancia para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multiresistentes. Sin embargo, las moléculas hasta ahora identificadas son tóxicas para el humano; la búsqueda de nuevos compuestos inhibitorios que no tengan efectos tóxicos permitiría aumentar la eficacia de la terapia antibacteriana, por lo que hay una continua necesidad de definir los detalles moleculares del mecanismo de resistencia. (Opazo C., 2009)

Por último en este estudio se encontró mayor incidencia de bacterias Gram positivas siendo *Staphylococcus coagulasa positivo* la más encontrada (69.7%) y la que presentó mayor porcentaje de multiresistencia a los antibióticos probados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amoils, S. **Showering with bacteria**. Nature. 360, 2009.
2. Blanpain, C., Horsley, V., and Fuchs. **Epithelial stem cells: Turning over new leaves**. Cell 128: 445–458, 2007.
3. Brock. **Biología de los microorganismos**. 11ª ED. pp 713-717, 2004
4. Burke, A. **Antibiotic Resistance**. Medical Clinic of North America 84(6), 2000.
5. Cordies, L., Machado, L., y Hamilton, M. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana**. Acta médica. 8 (1): 13-27, 1998.
6. D'Costa, V. **Sampling the antibiotic resistome**. Sciencemag. 373-377, 2006.
7. Dantas, G., Sommer, M. O., Oluwasegun, R.D., and Church, G. M. **Bacteria subsisting on antibiotics**. Science 320:100–103, 2008.
8. De Jawetz. **Microbiología médica**. Editorial Manual Moderno, 1997.
9. Departamento de Biología Molecular. **Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana**. Salud pública mexicana. 36(4):428-438, 1998.
10. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM), 2010.
11. Donald, W. **Making sense of antimicrobial use and resistance surveillance**. Eur Soc Clin Microbiol Infect;7(Suppl 5):S29-S36, 2006.
12. Eckburg, P.B., Bik, E.M., and Bernstein, C.N. **Diversity of the human intestinal microbial flora**. Science 308: 1635–1638, 2005.
13. Farran, E. W. **Bacterial resistance**. Antibiotic and chemotherapy.303-312, 1992.
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2008
15. Fierera, N., Hamadyc, M., Lauberb, C., and Knightd, R. **The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria**. PNAS. 17994-17999, 2008.

16. Gao, Z., Tseng, C.H., Pei, Z., and Blaser, M.J. **Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota.** Proc. Natl. Acad. Sci. 104: 2927–2932, 2007.
17. Gerard, D. **Evaluation of antibiotic usage: A comprehensive look at alternative approaches.** Rev Infect Dis; 3:745-753, 2006.
18. Hooper, D.C. **SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes.** Nature;427:72-74, 2000.
19. Hughes, P. and Pace, N.R. **Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach.** Trends Biotechnol. 14: 190-197, 2006.
20. Jorgensen J. **Antimicrobial Susceptibility testing. Special needs for Fastidious organism and difficult-to-detect resistance mechanisms.** Clinical Infectious diseases. 30:799-808, 2000.
21. Jorgensen, J.H. **Laboratory Issues in the Detection and Reporting of Antibacterial Resistance.** Infectious Disease Clinics of North America. 11(4):785-802, 1997.
22. Katherine, M. **Bacteriol.** 182, 6694–6697, 2006.
23. Law C, Maloney P, Wang D. **Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters.** Annu Rev Microbiol. 62: 289-305, 2008.
24. Livermore, D. M. **The need for new antibiotics.** Clin. Microbiol. Infect. 10: 1–9, 2004.
25. Maranan M.C., Moreira B., Boyle-Vavra S., and Daum R.S. **Antimicrobial Resistance in Staphylococci: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Clinical Relevance.** Infectious Disease Clinics of North America. 11(4):813-849, 1997.
26. Marples T. **Antibacterial therapy. Principles of selection and use of antibacterial agent.** Infectious Disease clinic of North America. 14(2), 2005
27. Martin, A.P. **Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities.** Appl. Environ. Microbiol. 68: 3673–3682, 2002.
28. Nikaido, H. **Multidrug resistance in bacteria.** Annual Review of Biochemistry. 78: 119-146, 2009.

29. Oliveira. **Body's hardworking microbes get some overdue respect.** ScienceMag. 1619, 2007.
30. Opazo, A., Mella, S., Domínguez, M., Bello, H., y González, G. **Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacterbaumanni* resistencia a antimicrobianos.** Sochinf. 26 (6): 499-503, 2009.
31. Paulsen I, Brown M, Skurray R. **Protondependent multidrug efflux systems.** Microbiol Rev. 60 (4): 575-608, 1996.
32. Pennisi, E. **Bacteria are picky about their homes on human skin.** ScienceMag. 1001, 2009.
33. Petersdor, RG. **Infectious disease 1947-1987;** a retrospective. Posgrad Med; 82:115-31, 1997.
34. Plascencia, L., Ojeda, A., y Vázquez, H. **Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México.** Salud pública de México. 219-226, 2005.
35. Poole, K. **Efflux-mediated antimicrobial resistance.** Antimicrob Chemother. 56: 20-51, 2005.
36. Ronald, RA. **Clinical trials of antimicrobial agents following licensure.** J Infect Dis 1; 159:3-16, 1999.
37. Sahm D.E., and Tenover, F.C. **Surveillance for the Emergence and Dissemination of Antimicrobial Resistane in Bacteria.** Infectious Disease Clinics of North America. 11(4):767-783, 1997.
38. Sanders, Ch. **β -lactamase resistance.** Supplement to u.s pharmacist, 1996.
39. Segre, J.A. **Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders.** J. Clin. Invest. 116: 1150–1158, 2006.
40. Sussmann O., Mattos L., y Restrepo A. **Resistencia bacteriana.** 2001.
41. Tafur, J., Torres, J., y Villegas, M. **Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas.** Centro Internacional de investigaciones médicas. 217-226, 2008.
42. Van Bambeke F., Balzi E., and Tulkens P. **Antibiotic efflux pumps.** Biochem Pharmacol. 60: 457-70, 2000.
43. W. van Veen, H. **Last of the multidrug transporters.** Nature. 926, 2010.

9. APÉNDICE

PRUEBAS BIOQUIMICAS (COCOS GRAM POSITIVOS)

CEPA	CATALASA	COAGULASA	MANITOL
A1BCH	+	+	+
A1AM	+	+	+
B1	+	+	+
D1AG	+	+	+
D1BCH	+	+	+
E1	+	+	+
A2BM	+	+	+
A2AG	+	+	+
B2AG	+	+	+
B2BCH	+	+	+
D2	+	+	+
E2AG	+	+	+
E2BCH	+	+	+
B3	+	-	-
C3	+	+	+
D3AG	+	+	+
D3BM	+	+	+
D3CCH	+	+	+
E3AG	+	-	-
E3BCH	+	-	-
B4	+	+	+
D4AG	+	+	+
D4BCH	+	+	+
E4AG	+	-	-
E4BCH	+	-	-

A5	+	+	+
B5	+	+	+
C5AG	+	-	-
C5BCH	+	-	-
D5	+	+	+
E5AG	+	+	+
E5BCH	+	+	+
A6	+	+	+
B6	-		
D6AG	+	+	+
D6BM	+	+	+
E6	+	+	+
B7AG	+	+	+
B7BCH	+	+	+
C7	+	+	+
D7	+	+	+
E7	+	+	+
A8AG	+	+	+
A8BM	+	+	+
A8CCH	+	+	+
B8	-		
C8AG	+	+	+
C8BCH	+	+	+
D8	+	+	+
A9	-		
B9	-		
D9AG	+	+	+
D9BCH	-		
A10	+	+	+

C10	+	+	+
D10AG	+	+	+
D10BCH	+	+	+
E10	+	+	+

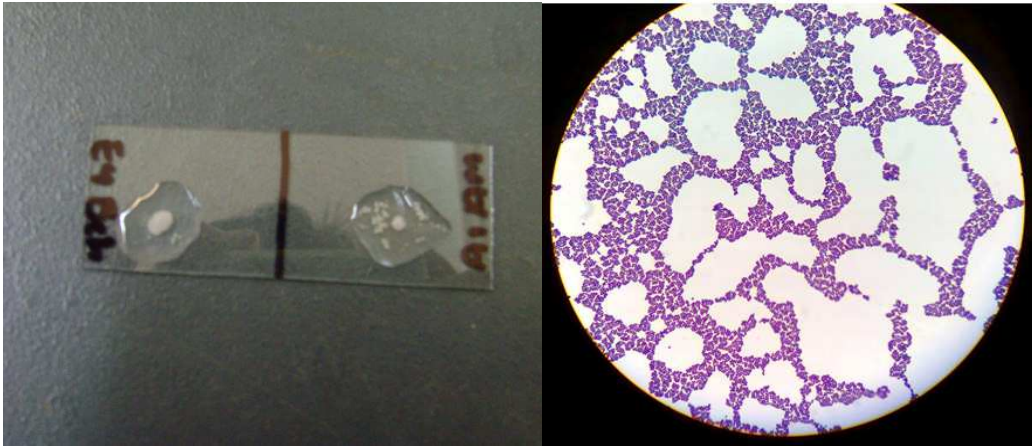


Figura 22. Prueba de la catalasa

Figura 23. Cocos Gram +

(BACILOS GRAM NEGATIVOS)

MUESTRA	KIA	CITRATO	SIM	VP	MIO	OF	OXIDASA
E8	-	+	MOV + H ₂ S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+
E9	-	+	MOV + H ₂ S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+
C9	-	+	MOV + H ₂ S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+

C2AG	-	+	MOV + H2S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+
C2BCH	-	+	MOV + H2S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+
C4AG	-	+	MOV + H2S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+
C4BCH	-	+	MOV + H2S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+
C6	-	+	MOV + H2S - INDOL-	VP -	MOV+ INDOL-	+/-	+

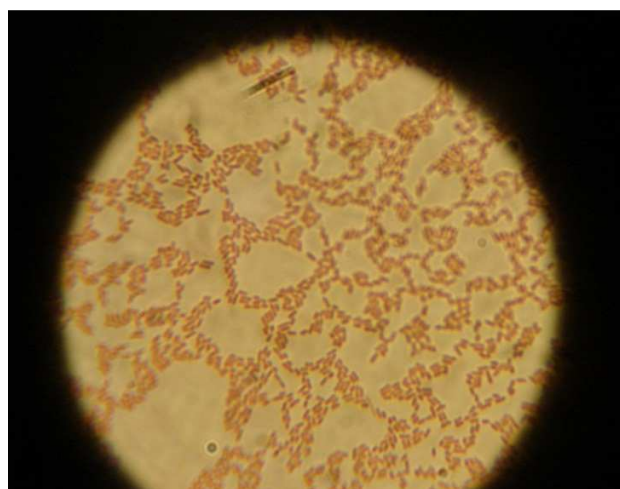


Figura 24. Bacilos Gram –

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Caldo BHI

Gramos por litro
Infusión de cerebro ternera 200.0
Infusión de corazón de res 250.0
Peptona de gelatina 10.0
Cloruro de Sodio 5.0
Fosfato disódico 2.5
Dextrosa 2.0

pH final: 7.4 ± 0.2

Suspender 37g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Medio Mc Conkey

Gramos por litro
Peptona 17.0
Pluripeptona 3.0
Lactosa 10.0
Mezcla de sales biliares 1.5
Cloruro de Sodio 5.0
Agar 13.5
Rojo neutro 0.03
Cristal violeta 0.001

pH final: 7.1 ± 0.2

Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio MSA

Gramos por litro
Cloruro de sodio 75.0
D-Manitol 10.0
Digerido pancreático de caseína 5.0
Digerido peptídico de tejido animal 5.0
Extracto de carne 1.0
Rojo fenol 0.025
Agar 15.0

pH final: 7.4 ± 0.2

Suspender 111 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Mueller Hinton

Gramos por litro
Infusión de carne 300.0
Peptona de caseína 17.5
Almidón 1.5
Agar 17.0

pH final: 7.4 ± 0.2

Suspender 38 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.