



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**BACTERIAS MULTIRRESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS EN PIEL SANA DE
ADOLESCENTES ASINTOMÁTICOS ENTRE
LAS EDADES DE 13 Y 15 AÑOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

GABRIELA GUADALUPE SÁNCHEZ GARCÍA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SECRETARIO: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

1er. SUPLENTE: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

2º 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:

Gabriela Guadalupe Sánchez García _____

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	4
2.1 ANTIBIÓTICOS	6
2.1.1 ANTIBIÓTICOS OCULTOS EN LOS ALIMENTOS	8
2.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	10
2.2 USO ADECUADO Y RACIONAL DE LOS ANTIBIÓTICOS	12
2.2.1 RECOMENDACIONES EN LA UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS	14
2.2.2 CONSECUENCIAS DEL USO INCORRECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS	15
2.3 RESISTENCIA BACTERIANA	16
2.3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA	18
2.3.1.1 RESISTENCIA NATURAL	19
2.3.1.1.1 MODIFICACIÓN QUÍMICA O HIDRÓLISIS DEL ANTIBIÓTICO POR ENZIMAS	22
2.3.1.1.2 MODIFICACIÓN DEL SITIO BLANCO DE ACCIÓN DEL ANTIBIÓTICO	24

2.3.1.1.3 MODIFICACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA	25
2.3.1.1.4 BOMBAS DE EXPULSIÓN	26
2.3.1.2 RESISTENCIA ADAPTATIVA	31
2.3.1.2.1 INDIFERENCIA AL FÁRMACO	31
2.3.1.2.2 PERSISTENCIA	32
2.3.1.2.3 BIOPELÍCULAS	33
2.3.2 RESISTENCIA A LOS PRINCIPALES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS	34
2.3.3 RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS ¿PROBLEMA CLÍNICO O TAMBIÉN ECOLÓGICO?	37
2.3.4 ESTRATEGIAS PARA ABORDAR EL PROBLEMA DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	39
2.4 LA PIEL DEL ADOLESCENTE	41
2.4.1 LA PIEL: UN HÁBITAT PARA ALGUNOS MICROORGANISMOS	42
3. OBJETIVO	46
3.1 OBJETIVO GENERAL	46
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	46

4. HIPÓTESIS	46
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	47
5.1 TOMA DE MUESTRAS	48
5.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	48
5.2.1 AISLAMIENTO EN MEDIO MSA Y McCONKEY	49
5.2.2 ANTIBIOGRAMA	50
5.2.3 REPLICAPLATING	50
5.2.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	53
5.2.5 PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1 RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	54
6.2 FRECUENCIA RELATIVA DE RESISTENCIA BACTERIANA A A LOS CUATRO ANTIBIÓTICOS PROBADOS	54
6.3 ANTIBIOGRAMA	56
6.4 DISTRIBUCIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN FUNCIÓN DEL GÉNERO	57
6.5 REPLICA PLATING	58

6.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	59
6.7 PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO	60
7. CONCLUSIONES	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUCCIÓN

A mediados del siglo XX se pensaba que las enfermedades infecciosas disminuirían su incidencia y dejarían de ser un problema serio para la salud del hombre, sin embargo, la realidad se encargó de mostrar que la lucha contra los microorganismos productores de enfermedades estaba lejos de ser ganada y que, en el vaivén dialéctico de la relación entre el ser humano y los microorganismos, estos nos iban a dar nuevas sorpresas. Si bien es cierto que el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming ha permitido salvar millones de vidas en todo el mundo, también implicó el inicio de un gigantesco "experimento" de intervención genética en los seres vivos más abundantes del planeta: las bacterias, desarrollándose una verdadera supervivencia de las especies más aptas, las especies resistentes. (Hart, 2001)

Desde 1945, Fleming prevé los riesgos potenciales ligados a la utilización de los antibióticos. Temía que su utilización a gran escala seleccionara bacterias resistentes; en su laboratorio, observó que bacterias sensibles a la penicilina al comienzo del experimento conseguían multiplicarse en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico. Constató que las bacterias sensibles habían sido destruidas y las bacterias resistentes se habían multiplicado sin límite. (Torres, 2012)

Ya en el año 1947 se comenzó a detectar resistencia a la estreptomina entre los tuberculosos, el 80% recayeron a los tres meses debido a la formación de bacilos resistentes a la estreptomina. (Embí, 2005).

Para la década de 1950, con la aparición de una gama importante de antimicrobianos, se pensaba que todas las infecciones bacterianas serían tratables con éxito. Poco tiempo después el mundo se vio obligado a abandonar esa idea, debido a la aparición de resistencias a antibióticos de patógenos tales

como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. (Becerra, 2009)

En los 80 se demostró que los enterococos podían adquirir una resistencia a antibióticos como los aminoglucósidos (entre los que se encuentra la vancomicina, uno de los más potentes). Más tarde se detectó resistencia a la ampicilina y la lista fue creciendo. Se constató también que numerosas cepas son resistentes a moléculas que han sido muy utilizadas, pero que han dejado de emplearse en razón de su toxicidad, como por ejemplo el cloranfenicol y sus derivados. Un trabajo publicado en el *New England Journal of Medicine* y realizado por los equipos de los profesores Patrice Courvalin y Jean-Yves Riou (del Instituto Pasteur de París) describió 12 cepas diferentes de bacterias altamente resistentes al cloranfenicol, observadas en 1987 y 1997. (Embid, 2005)

Ya en el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) apuntaba hacia el aspecto global de la resistencia a los antimicrobianos, definiéndolo como un problema complejo, impulsado por múltiples factores que exigía la búsqueda de respuestas multisectoriales. Parece que todas estas alertas no tuvieron los efectos esperados y sigue siendo una cuestión de apremiante actualidad. En el año 2011, la OMS seleccionó la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos como el tema del Día Mundial de la Salud y destacó la necesidad de establecer una estrategia común y coordinada y de buscar las causas relacionadas con la emergencia y extraordinaria diseminación de bacterias multirresistentes. En el año 2012, se publicó el documento "*The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action*", que plantea de nuevo la apremiante necesidad de abordar este tema. (Hart, 2001)

Por todo lo anterior, el alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es, sin duda, uno de los mayores problemas actuales de salud pública ya que estos compuestos constituyen una de las principales herramientas para controlar y tratar las infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en

veterinaria. Los investigadores, sociedades científicas y autoridades sanitarias han alertado sobre las graves consecuencias de este problema y han coincidido en la necesidad de analizar en profundidad este fenómeno de la resistencia. (Torres, 2012)

Por lo que en este trabajo, se evaluó la posible existencia de bacterias cultivables multirresistentes a antibióticos en piel sana de 10 adolescentes asintomáticos de la Ciudad de México de entre las edades de 13 y 15 años, escogiéndose 5 zonas del cuerpo, cubriendo las zonas húmedas, secas y grasosas: pliegue alar (A, grasosa), ombligo (B, húmeda), palma de la mano cerca del meñique (C, seca), fosa poplítea (D, húmeda) y conducto auricular externo (E, grasosa).

Se observó que la especie *Staphylococcus coagulasa positivo* fue la que se presentó en un 72.2%, seguida de *Staphylococcus sp.* con un 9.3 % y *Streptococcus sp.* se presentó en un 4.2% entre las Gram positivas.

En relación a las Gram negativas, la especie *Pseudomonas aeruginosa* se presentó en un 9.4 %, seguida de *Escherichia coli* con un 3.8% y *Enterobacter aerogenes* con un 1.1%.

Cabe señalar que el género femenino fue el que presentó mayor porcentaje de multirresistencia bacteriana como se ha reportado en la literatura (Segre, 2006). Estos resultados son de interés y de suma importancia, debido a que en un estudio anterior realizado en este mismo laboratorio, pero con niños de edad preescolar, se obtuvieron resultados similares, ya que se encontraron las mismas bacterias multirresistentes, a excepción de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. Esto podría causar un potencial problema de salud pública, porque se observa que la multirresistencia bacteriana va en aumento y se corre el riesgo de que los individuos en edades posteriores, tengan que recurrir a dosis cercanas a la tóxica, para poder controlar posibles enfermedades e infecciones bacterianas.

2. GENERALIDADES

Desde su introducción como fármacos hace unos sesenta años, los agentes quimioterapéuticos antimicrobianos, incluyendo antibióticos, algunos naturales y otros semisintéticos, y otros agentes sintéticos como las sulfonamidas y las quinolonas, han jugado un papel esencial, junto con medidas preventivas como la vacunación, en la disminución de la morbilidad y la mortalidad causadas por las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el amplio uso, mal uso y abuso de los antibióticos, no solamente en el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas en el ser humano, sino también en medicina veterinaria, como promotores de crecimiento en la producción animal y en agricultura, han ejercido una inmensa presión de selección para el surgimiento y la diseminación de los mecanismos de resistencia entre diversas poblaciones bacterianas. (García, 2001)

La utilización inadecuada e irracional de los antibióticos es frecuente en la práctica médica y constituye uno de los factores más importantes en la generación y la selección de resistencia bacteriana. La magnitud del problema es tal que en el año 2000, The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (E.U.A.) comunicó que se encontraban en desarrollo 137 nuevos antibióticos, 19 de ellos directamente focalizados en microorganismos multirresistentes. (Hart, 2001)

Como consecuencia de la infección por un patógeno resistente a múltiples antibióticos, el paciente prolonga su estadía en el hospital, exige con frecuencia técnicas complejas de diagnóstico y, debido a que existen mayores posibilidades de falla terapéutica, requiere antibióticos más caros y aumenta su riesgo de muerte. Por lo tanto la resistencia bacteriana a los antibióticos no debe ser considerada sólo en términos médicos sino también económicos. (Jasovich, 2003)

En el ámbito hospitalario 68 a 87% de los pacientes reciben antibióticos, en más del 50% de los casos de manera inapropiada. La mayoría de estos casos corresponden a tratamientos empíricos realizados en instituciones donde documentar microbiológicamente las infecciones no es una práctica rutinaria. En las unidades quirúrgicas 40 a 50% de los pacientes reciben antibióticos innecesariamente. Asimismo, las profilaxis quirúrgicas son frecuentemente inapropiadas tanto en la elección de los antibióticos como en su duración. (García, 2001)

La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha ido paralela a la incorporación de los mismos al arsenal terapéutico. La industria farmacéutica fue modificando la estructura química de las moléculas de antibióticos ya conocidos y buscó, asimismo, nuevos antibióticos que fuesen esquivando los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias. Sin embargo, aunque estas nuevas moléculas fueron eficaces durante unos años, las bacterias desarrollaban nuevos mecanismos que incluían la resistencia a estos nuevos antibióticos. Ha existido durante décadas una verdadera batalla entre los investigadores y la industria farmacéutica en su deseo de buscar nuevas moléculas activas frente a las bacterias. Esta “batalla” la han ganado casi siempre las bacterias. (Torres, 2012)

2.1 ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son compuestos naturales o sintéticos, con actividad inhibitoria o bactericida específica frente a las bacterias. Los antibióticos son productos del metabolismo secundario de diversos microorganismos del suelo que participan en procesos ecológicos de competencia por nichos nutricionales y representan un ejemplo de diferenciación y especialización microbiana. (García, 2001)

Los antibióticos han sido uno de los mayores descubrimientos en medicina, tal es así que su aparición ha marcado dos etapas bien definidas en la medicina; era preantibiótica y era posterior a la aparición de los antibióticos. Millones de pacientes sobrevivientes a la sepsis marcan la principal diferencia entre estas dos etapas, no cabe duda que ningún otro medicamento ha salvado tantas vidas en el planeta. Basta decir que las sulfas descubiertas en Alemania en 1935 y la aplicación de la penicilina en Inglaterra en 1940, jugaron un papel preponderante en la segunda guerra mundial en lo que se refiere a mortalidad bélica. (Maguiña, 2006)

El uso de los antibióticos es requerido para el tratamiento, control y prevención de las enfermedades infecciosas de humanos y animales. Estos compuestos se emplean con estos fines principalmente en medicina humana y en veterinaria, pero se utilizan también, aunque en menor medida, en ganadería. (Torres, 2012)

Aunque los datos de consumo de antibióticos no están suficientemente documentados, se considera que, en la actualidad, aproximadamente la mitad de los mismos se consumen en medicina humana y la otra mitad en veterinaria, contribuyendo en ambos casos de una manera importante a la selección de bacterias resistentes a estos compuestos. Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella y podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección. (Embid, 2005)

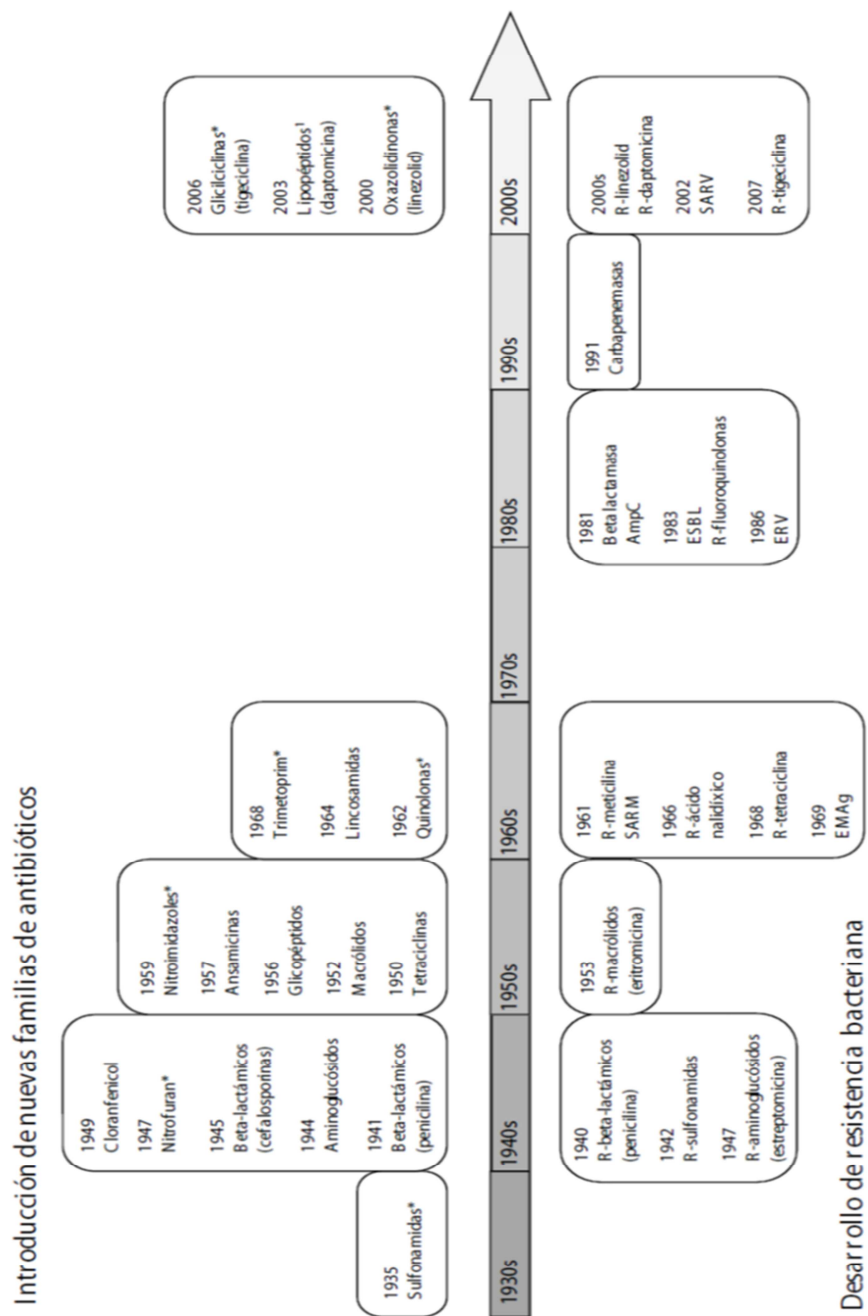


Figura1. Introducción en el arsenal terapéutico de las distintas familias de antibióticos (se incluyen también los antimicrobianos de naturaleza sintética marcados con un asterisco) y emergencia de resistencia. Asimismo se indican las fechas de detección de mecanismos de resistencia de especial relevancia clínica FDA hasta 2003. (Embidi, 2005)

2.1.1 ANTIBIÓTICOS OCULTOS EN LOS ALIMENTOS

Durante mucho tiempo, los antibióticos también se han empleado como promotores del crecimiento de animales, especialmente para el engorde de aves y de cerdos.

Desde los años 50 los antibióticos son utilizados como aditivos alimentarios en la ganadería industrial para promover el crecimiento de los animales y tratar o prevenir las enfermedades en aumento. Estas enfermedades están ligadas a las condiciones de concentración carcelaria que la agricultura industrial impone a los animales. (Torres, 2012)

Los antibióticos y los otros agentes antimicrobianos son utilizados en cantidades enormes en el mundo entero para la producción de alimentos de origen animal destinados al consumo humano.

Cada año se producen cientos de millones de toneladas de carne. Las bacterias farmacorresistentes y otros microorganismos son transmitidos al consumidor a través de la cadena alimenticia y corren el riesgo de provocar enfermedades o de transferir su resistencia a los agentes patógenos humanos.

Las bacterias que resisten a los antibióticos utilizados en el animal circulan entre los animales y el hombre especialmente por medio de alimentos contaminados. En ciertos casos, las bacterias en cuestión resisten también a los antibióticos utilizados en el hombre. (Embid, 2005)

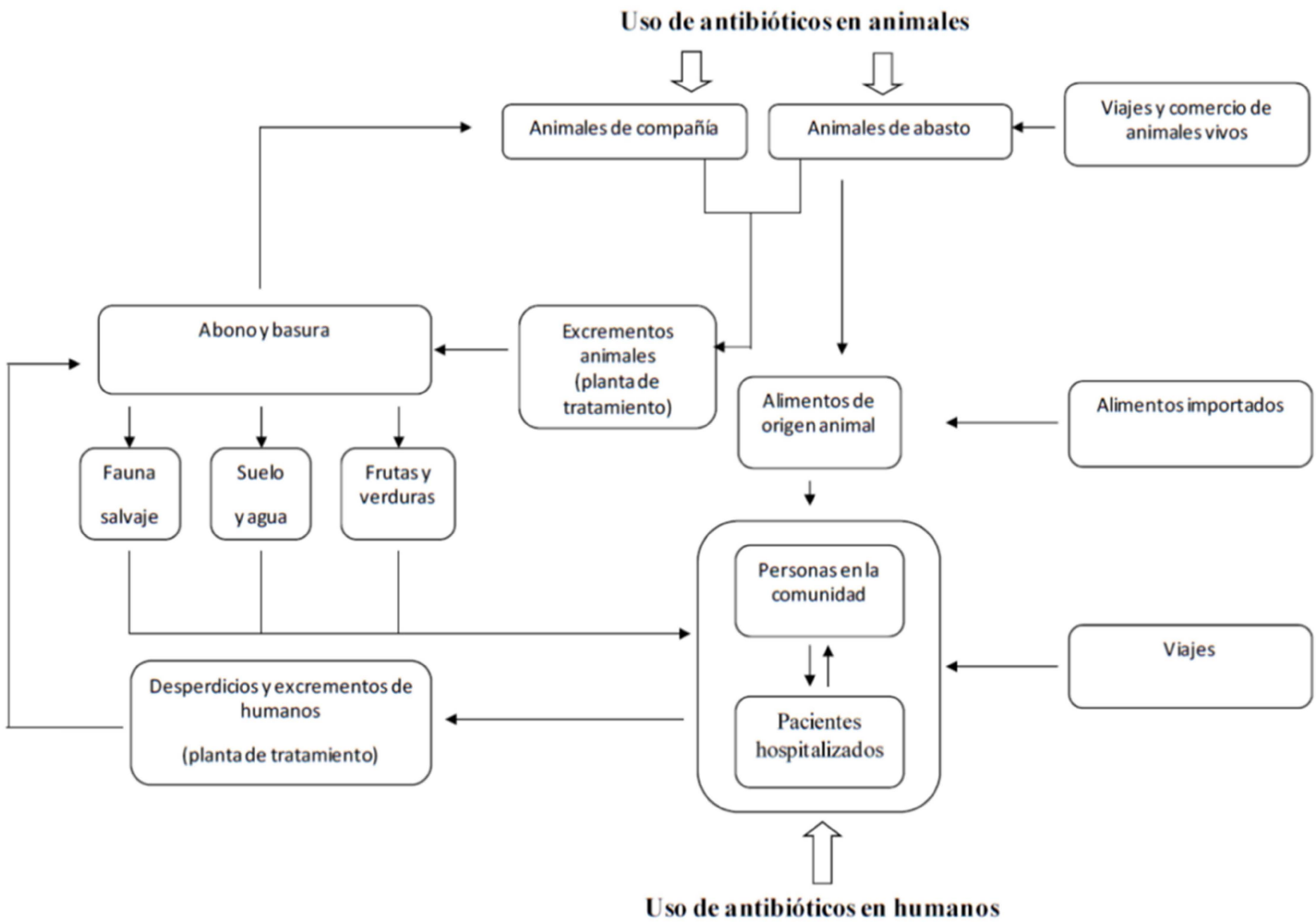


Figura 2. Rutas de diseminación en diferentes ecosistemas de bacterias resistentes a antibióticos y de genes de resistencia. (Embid, 2005)

2.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Para conseguir destruir o inhibir a los microorganismos, los antibióticos deben atravesar la barrera superficial de la bacteria y después fijarse sobre su sitio blanco, es decir, sobre alguna de las estructuras o mecanismos bioquímicos que le son necesarios para multiplicarse o para sobrevivir.

Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y a veces múltiples, pero todos operan en alguno de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular de la bacteria sobre la que actúan. Así los antibióticos intervienen en moléculas de procesos biológicos esenciales de las bacterias, por ejemplo: la ADN girasa en la replicación del ADN, la ARN polimerasa en la síntesis del ARN, los ribosomas en la síntesis de proteínas y las transpeptidasas en la síntesis del peptidoglucano que conforma la pared celular. Los antibióticos actúan en diferentes niveles, las quinolonas inhiben la replicación del ADN, la rifampicina suprime la síntesis de ARN y los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol anulan la síntesis de las proteínas. El grupo de los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos) inhibe la síntesis de la pared celular. (Sánchez, 2007)

La mayoría de los antibióticos comercializados o en fase avanzada de desarrollo clínico actúan inhibiendo procesos metabólicos vitales para las bacterias, relacionados con la síntesis de la pared, las proteínas y los ácidos nucleicos, o determinan la desestructuración de las membranas lipídicas que las separan del entorno. El conocimiento del mecanismo de acción de los antibióticos ayuda a predecir el tipo de actividad antibacteriana, la posibilidad de sinergia y, en cierta medida, los efectos tóxicos eventuales.

La erradicación microbiológica se correlaciona con parámetros farmacodinámicos precisos y, según el tipo de antibiótico, depende del tiempo que la concentración sérica del fármaco excede la concentración mínima inhibitoria (CMI) o bien del cociente entre la concentración sérica máxima y la CMI (actividad dependiente de la concentración). (Martínez, 2006)

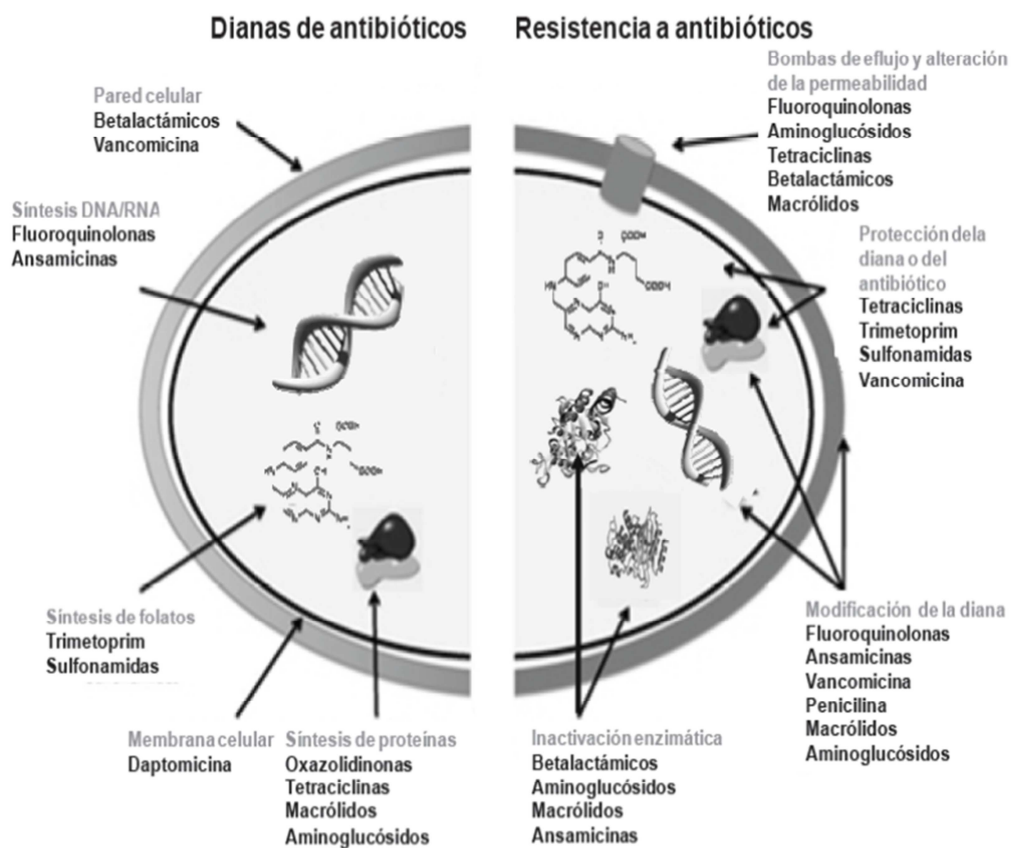


Figura 3. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción (Martínez, 2006)

2.2 USO ADECUADO Y RACIONAL DE LOS ANTIBIÓTICOS

Un primer problema con su uso fue la aparición de reacciones adversas entre leves a severas, posteriormente se ha sumado la aparición cada vez más frecuente de bacterias resistentes y multirresistentes.

La aparición de estas bacterias conlleva a un alto costo para los sistemas de salud. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América se ha calculado en más de 7 mil millones de dólares anuales, por lo que ha sido clasificado como un riesgo de seguridad nacional. En el caso de los países en vías de desarrollo, el gasto del presupuesto en salud en antibióticos es en un promedio de 35% debido a la creciente resistencia antibiótica y el mal uso que se le da en los centros de salud; esto incrementa el problema de la resistencia (además de la facilidad de conseguir los medicamentos sin receta médica y la venta de medicamentos de dudosa procedencia). (Castillo, 2006)

Entre los problemas que enfrenta el médico, existen tres importantes:

- Desconocimiento y falta de confianza. Al no tener la seguridad diagnóstica, prefiere usar algún antibiótico por dos razones principales: para no perder la confianza del paciente (el paciente percibe que es tratado con un medicamento) y por la presión médico-legal de no caer en negligencia médica.
- Presión del mercado. Dada por la inseguridad y el desconocimiento; la situación actual obliga, a veces, a medicar de más, para no perder el 'cliente' (el paciente),
- Presión del paciente. En estos tiempos el paciente tiene un mayor acceso a la información (internet, medios informativos) y exige, muchas veces, ser tratado con los medicamentos que él ve y/o lee. (Maguiña, 2006)

Existen otros problemas de tipo cultural, social, religioso, etc que también influyen positiva o negativamente en la terapia racional de los medicamentos. El antibiótico ideal es el que resulta más eficaz, menos tóxico, retarda el surgimiento de cepas resistentes, es de menor costo y de más fácil administración. Obviamente, no existe. Pero las características de eficacia, toxicidad y costo son consideraciones básicas en la elección del fármaco. (Castillo, 2006)

Utilizar un antibiótico de manera racional significa relacionar correctamente el agente etiológico de la infección con el fármaco que se elige. (Jasovich, 2003)

Los antibióticos sólo deben utilizarse, con finalidad terapéutica, cuando existe la sospecha clínica y/o microbiológica de infección. La dificultad de su utilización radica en diferenciar entre sepsis (infección) y respuesta inflamatoria sistémica, que puede ser debida a otras causas no infecciosas (traumatismo, poliartritis, pancreatitis, hemorragia, entre otras) y que, inicialmente cursan con la misma expresividad clínica, es decir solo deben emplearse cuando son necesarios, sobretodo en el medio extrahospitalario y cumplir adecuadamente las prescripciones médicas en dosis y tiempo. Esto requiere del estudio previo de la prevalencia por áreas de las distintas infecciones y de los hábitos y costumbres de la prescripción médica y las características de los pacientes. (Hart, 2001)

En la mayoría de las instituciones, las unidades hospitalarias destinadas a la asistencia de los pacientes críticos constituyen las áreas de mayor utilización de antibióticos y el principal reservorio de patógenos multirresistentes; es lógico entonces que las nuevas estrategias propuestas para optimizar el uso de antibióticos estén focalizadas allí. (Álvarez, 2000)

2.2.1 RECOMENDACIONES EN LA UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Entre las primeras recomendaciones dirigidas a médicos y farmacéuticos está, educar al personal médico encargado de la prescripción de antibióticos respecto a la importancia del uso adecuado de los mismos, además de fomentar el uso de guías de buenas prácticas así como desarrollar cursos de adiestramiento y actualizaciones sobre diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas e incluso sobre los aspectos farmacológicos de las distintas familias de antibióticos; clasificación, espectro, mecanismos de acción, efectos adversos, dosis e intervalos de dosis y duración de tratamiento. (Maguiña, 2006)

Otra recomendación relevante va dirigida a la población; educar a los pacientes y a la comunidad sobre la importancia del uso adecuado de antibióticos y su repercusión sobre la resistencia bacteriana. La presión del paciente y/o sus familiares es uno de los factores implicados en el uso inadecuado de los antibióticos, unido a esto, enseñar a los pacientes medidas sencillas que pueden evitar la transmisión de las infecciones y de cepas de bacterias resistentes, como es el lavado de manos frecuente y la higiene de los alimentos. Sumado a estos enseñar a los pacientes que existen otras opciones para aliviar los síntomas, que la gran mayoría de las infecciones comunitarias son virales, sobre los cuales los antibióticos no tienen efecto, que fiebre no es igual a infección bacteriana y mucho menos a antibióticos, además de promover la no automedicación sin previa consulta facultativa. (García, 2001)

En las recomendaciones a hospitales sobresalen; la creación de comités terapéuticos, los cuales promoverán la creación de protocolos de antibióticos y serán responsables de su revisión y control, incluso podrá limitar la prescripción y uso de determinados antibióticos previa discusión en el comité de expertos. Además las instituciones deberán crear programas de control de infecciones nosocomiales. (Jasovich, 2003)

Otra recomendación local y nacional es la vigilancia de la aparición de cepas resistentes y su extensión, eso va contemplado en los mapas microbiológicos de las instituciones y en los laboratorios de referencia nacional. La misma vigilancia se debe aplicar en la agricultura, en la aparición de cepas resistente en animales de consumo humano, provocadas sobre todo por la utilización de antibióticos para engorde animal. Pueden ser transmitidas al hombre, tanto en la manipulación y cría como en el consumo de su carne. (García, 2001)

La última recomendación es la incorporación en el programa de estudio de formación médica el tema de la resistencia bacteriana y el uso adecuado de los antibióticos. Abordar esta temática desde la etapa de formación traerá paralelamente grandes beneficios, sobre todo si se asocia a una sólida formación en el manejo de los antibióticos y sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas. (Torres, 2012)

2.2.2 CONSECUENCIAS DEL USO INCORRECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS

Una mala indicación del antibiótico, o un mal cumplimiento de la prescripción, puede provocar:

- Fracaso terapéutico.
- Desarrollo de resistencia bacteriana.
- Enmascaramiento de procesos infecciosos.
- Cronificación: la falta de erradicación de un número suficiente de bacterias dará lugar a la persistencia de algunas que mantienen su grado de patogenicidad sin ocasionar manifestaciones agudas.
- Recidiva: las cepas supervivientes, sean resistentes o sensibles, inician una nueva proliferación que provocará una recaída o una reinfección.
- Efectos adversos debidos a la acción del medicamento. La toxicidad de algunos antibióticos es potencialmente grave y su uso es inaceptable si el paciente no necesitaba el fármaco. (Pérez, 1998)

2.3 RESISTENCIA BACTERIANA

Desde hace algunos años estamos inmersos en el problema de la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Esto comenzó pronto, pues al poco tiempo de introducirse la penicilina se detectaron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes. En la década de 1950, ya había cepas resistentes de *Shigella sp*, para las que eran inútiles sulfamidas, tetraciclinas, estreptomina y cloranfenicol. (Gobernado, 2003)

En la actualidad hay más de veinte especies bacterianas habituales entre nosotros, cuya resistencia a los antibióticos tiene un impacto negativo en la salud humana. Un 90% de *Staphylococcus aureus* son ahora resistentes a la penicilina, pero además un 15% a 35% son también resistentes a metilina y se ha observado la aparición de cepas con resistencia total a la vancomicina.

Desde las primeras cepas de *Streptococcus pneumoniae* con baja sensibilidad a la penicilina descritas en 1977 y con multiresistencia en 1986, hemos llegado a un 40% de cepas no sensibles; hecho acompañado además, de resistencia en mayor o menor grado a macrólidos, cefalosporinas y quinolonas, y la presencia de cepas tolerantes a la vancomicina. (Torres, 2012)

De otras bacterias, preocupa *Escherichia coli*, uno de los patógenos más comunes en el ser humano, causante de infecciones urinarias, intestinales, intraabdominales, bacteremias y otras. Ha adquirido resistencia a diversos antibióticos; la mitad de las cepas son resistentes a ampicilina y clotrimazol, un 20% a las fluoroquinolonas, un 15% a amoxicilina-ácido clavulánico y un porcentaje menor a las cefalosporinas de tercera generación. (Garza, 2009)

La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación, ya sea en nosocomios o en el ambiente. Esto reduce las opciones terapéuticas, lo que repercute directamente en el éxito de la terapia antimicrobiana para combatir las infecciones secundarias producidas por estos patógenos, además de provocar elevados índices de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios. (Jasovich, 2003)

La resistencia bacteriana impone pérdidas incalculables tanto en vidas humanas como en dinero, además de poner en peligro la eficacia de múltiples programas de salud. Hoy es reconocido que el uso inadecuado y desmedido de los antibióticos es la piedra angular del fenómeno de la creciente multirresistencia bacteriana, fenómeno que va dejando a los médicos de asistencia cada vez con menos arsenal terapéutico frente a las infecciones.

En septiembre del 2001 la OMS presentó la primera estrategia global para combatir la aparición y desarrollo de la resistencia bacteriana, haciendo un llamado a todos los que de una forma u otra participan en el proceso de producción, comercialización y consumo de antibióticos; medicina humana, veterinaria, agricultura, consumidores. (Maguiña, 2006)

En la medida en que se usan los diferentes antibióticos se seleccionan bacterias resistentes a múltiples fármacos. El desarrollo de nuevas herramientas moleculares de la genómica y proteómica, como el PCR en tiempo real, pirosecuenciación de ADN, espectrometría de masas, microarreglos de ADN y bioinformática, permite conocer en forma más estrecha la fisiología y estructura de las bacterias y los mecanismos de resistencia a los antibióticos. Estos estudios hacen posible identificar nuevos blancos farmacológicos y diseñar antibióticos específicos para suministrar tratamientos más certeros que combatan las infecciones producidas por bacterias. (Garza, 2009)

2.3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

Es evidente que los microorganismos productores de antibióticos también posean mecanismos de resistencia a los mismos antibióticos que producen. Paralelamente, en esta competencia dinámica, otros microorganismos han desarrollado sus propios mecanismos de resistencia o los han adquirido directamente de los microorganismos productores de antibióticos.

La capacidad de producir antibióticos y los mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos son, entonces, el resultado de un intenso proceso evolutivo ocurrido durante miles de millones de años en la naturaleza. La diseminación de estos mecanismos de resistencia no conoce barreras geográficas, biológicas ni sociales. (García, 2001)

La resistencia a antimicrobianos es un problema de salud pública. Los mecanismos pueden ser naturales o adaptativos. Los primeros pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, expresar sistemas expulsión que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, modificar el sitio blanco del antimicrobiano o generar una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco.

Las bacterias pueden ser resistentes intrínsecamente a uno o más agentes antimicrobianos, pueden adquirir la resistencia por mutaciones de novo o por genes de resistencia de otros organismos, así como por adaptaciones metabólicas al fármaco. (Becerra, 2009)

Las bacterias son resistentes a los antibióticos debido a la expresión de diferentes mecanismos de resistencia. Según sean el grupo del antibiótico y la especie bacteriana, estos mecanismos se pueden agrupar en cuatro: a) modificación química o hidrólisis del antibiótico mediante la adenilación, acetilación, fosforilación o hidrólisis (esta última por β -lactamasas); b) modificación del sitio blanco, debido a mutaciones espontáneas ocurridas en los genes que codifican al blanco de acción del antibiótico, como la ARN polimerasa, el ARN ribosomal 16S, las PBP (proteínas fijadoras de penicilina) y la ADN girasa; c) modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana debido a la sustitución de las proteínas de membrana externa (porinas) al modificar su calibre o polaridad interna; y d) expulsión del antibiótico debido a la sobreproducción de bombas de expulsión que impide el acceso del antibiótico al sitio blanco en la bacteria. (Garza, 2009)

2.3.1.1 RESISTENCIA NATURAL

La adquisición de material genético por las bacterias susceptibles a antimicrobianos de bacterias con resistencia ocurre a través de conjugación que implica un contacto físico directo entre bacteria donante y bacteria receptora y por lo cual el plásmido pasa de una a otra, transformación por la cual una bacteria llamada «competente» incorpora ADN desnudo, presente en el medio o transducción durante la cual el ADN es transportado por un bacteriófago o con transposones que a menudo facilitan la incorporación de genes de resistencia múltiple al genoma o plásmido. El uso de agentes antimicrobianos también crea una presión selectiva para el surgimiento de cepas resistentes. (Maguiña, 2006)

De los 3, el más importante, por su frecuencia y por las consecuencias clínicas que ocasiona, es la conjugación, que está mediada por fragmentos de ADN extracromosómico denominados plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN circular, que no se pueden replicar de forma autónoma pues requieren proteínas de origen cromosómico para ello.

No todos los plásmidos se pueden transferir de una bacteria a otra; los plásmidos conjugativos (algunos de los cuales contienen genes de resistencia) sí lo hacen porque codifican proteínas que aseguran su paso desde bacterias que los contienen a bacterias que carecen de ellos. En ocasiones, se movilizan también plásmidos no conjugativos de resistencia, gracias a su capacidad para aprovechar el proceso de transferencia puesto en marcha por otro plásmido conjugativo que esté en la misma bacteria donante. Luego, los genes plasmídicos pueden diseminarse a otros elementos genéticos o integrarse en el cromosoma bacteriano, asegurando así una mayor estabilidad. (Martínez, 2006)

Hay otros elementos genéticos móviles que también tienen importancia en la adquisición de genes de resistencia, de los que los más relevantes son los transposones y los integrones. Los transposones codifican una enzima (transposasa) que les permite transferirse entre diferentes elementos del genoma bacteriano. Algunos transposones son conjugativos y pueden transferirse entre cromosomas de 2 bacterias distintas; son, sobre todo, importantes en enterococos (resistencia a tetraciclinas y glucopéptidos) y en estreptococos. Los transposones no conjugativos (implicados en la resistencia a macrólidos, glucopéptidos y aminoglucósidos en Gram positivos) pueden integrarse en plásmidos transferibles y lograr también su diseminación entre microorganismos. (Jasovich, 2003)

Mediante la transformación, algunas bacterias captan moléculas de ADN de su entorno y las incorporan a su genoma por recombinación. Un ejemplo de importancia es la aparición de resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae* por la recombinación entre genes propios y genes de otras estirpes de *S. pneumoniae* o incluso de otros *Streptococcus*, que codifican proteínas fijadoras de penicilina (PBP) con menor afinidad que las PBP originales, así se forman lo que se denominan genes en mosaico.

Los bacteriófagos pueden incorporar a su material genético fragmentos de ADN procedentes de una bacteria que han colonizado previamente y cuando invaden un nuevo huésped son capaces de transferirlo mediante el proceso de transformación. Algunas betalactamasas, como las de *Staphylococcus aureus*, se diseminan mediante este mecanismo.

Cuando un microorganismo ha adquirido un gen de resistencia, éste puede presentar mutaciones de igual forma a la descrita para el genoma bacteriano original. (García, 2001)

Tabla 1. Ejemplos de resistencia codificada por plásmidos

Antimicrobiano	Proteína	Mecanismo	Especies
β-lactámicos	β-lactamasas	Hidrólisis del antimicrobiano	Gram negativos, Gram positivos
Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras	Acetilación, fosforilación, adenilación	Gram negativos, Gram positivos
Quinolonas	Familia Qnr	Protección de las topoisomerasas de clase II	Enterobacterias
Glucopéptidos	Múltiples (ligasas...)	Alteración del peptidoglucano	<i>Enterococcus spp</i> , Otros Gram positivos
Macrólidos	Metilasas	Metilación del ARN ribosómico	Gram positivos

2.3.1.1.1 MODIFICACIÓN QUÍMICA O HIDRÓLISIS DEL ANTIBIÓTICO POR ENZIMAS

La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los Gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las Gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas. (Embid, 2005)

Escherichia coli produce la betalactamasa AmpC, codificada por un gen cromosómico. La mayoría de las cepas producen la enzima en muy baja cantidad, pero algunas mutaciones del promotor o del atenuador del gen blaAmpC causan una hiperproducción de trascendencia clínica. En *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* y algunas otras enterobacterias, en *Pseudomonas aeruginosa* y en otros bacilos Gram negativos no fermentadores la AmpC se produce habitualmente en gran cantidad, y además las mutaciones que conducen a su hiperproducción son tan frecuentes, que estas especies son naturalmente resistentes a muchos betalactámicos. De forma análoga, *Klebsiella sp* es resistente a penicilinas o *Proteus vulgaris* lo es a cefalosporinas, porque de forma basal producen otro tipo betalactamasas cromosómicas (de clase A). (Martínez, 2006)

El problema de mayor actualidad en relación con la resistencia mediada por betalactamasas son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), capaces de hidrolizar todos los betalactámicos de uso habitual salvo cefamicinas y carbapenems. Se conocen varias familias de BLEE (TEM, SHV, CTXM). Las cepas que producen estas enzimas se han aislado tradicionalmente en el hospital, pero durante los últimos años cada vez se reconocen con más frecuencia en el medio extrahospitalario (en particular cepas de *E. coli*, que producen enzimas CTX-M).

El mecanismo clínicamente más relevante de resistencia a los aminoglucósidos, son las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, de las que se conocen 3 grandes grupos en función del tipo de reacción química por la que modifican estos antibióticos: N-acetilación, O-nucleotidilación y O-fosforilación. Los genes correspondientes con frecuencia forman parte de integrones y transposones, que suelen estar movilizados por plásmidos. (Jasovich, 2003)

Una enzima determinada puede modificar varios compuestos y, a su vez, un mismo aminoglucósido puede ser sustrato de varias enzimas. Además, una misma bacteria puede expresar más de una enzima, o asociar su expresión a otros mecanismos de resistencia. (Martínez, 2006)

2.3.1.1.2 MODIFICACIÓN DEL SITIO BLANCO DE ACCIÓN DEL ANTIBIÓTICO

En este mecanismo la bacteria actúa impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel de la ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) y de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). (Embid, 2005)

Este mecanismo de resistencia se refiere 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.

Este mecanismo es utilizado principalmente 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. Se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como la pared celular, las subunidades 50s y 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. (Cordies, 1998)

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 Gyr A y Gyr B que codifican para las topoisomerasas II y IV. Característicamente, las mutaciones mencionadas tienen localizaciones cromosómicas y no en plásmidos. (Mella, 2009)

2.3.1.1.3 MODIFICACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA

Las bacterias pueden sufrir mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). (Embid, 2005)

Muchos antimicrobianos son compuestos hidrófilos que atraviesan la membrana de las bacterias Gram negativas a través de proteínas formadoras de poros (con frecuencia inespecíficos) denominadas porinas. Algunos antibióticos también son capaces de penetrar directamente a través de la bicapa de lipopolisacárido y de fosfolípidos de esta membrana. (Sánchez, 2007)

Las mutaciones en genes estructurales o reguladores que afectan la expresión de porinas o de lipopolisacárido pueden producir una disminución de la penetración, que termina causando un cierto grado de resistencia inespecífica, que afecta a compuestos de varias familias (betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas). Un caso particular es el que ocurre en *Pseudomonas aeruginosa*, donde la pérdida de una porina específica (OprD, utilizada para la penetración de ciertos aminoácidos y otros compuestos) ocasiona resistencia a los carbapenems.

Otro ejemplo de trastornos de la permeabilidad se relaciona con los aminoglucósidos. El paso de estos compuestos a través de la membrana citoplásmica es un proceso que depende del oxígeno, por lo que son inactivos frente a bacterias anaerobias y poco activos frente a *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (Martínez, 2006)

2.3.1.1.4 BOMBAS DE EXPULSIÓN

Otro mecanismo de resistencia importante es evitar que el antibiótico se incorpore a la célula bacteriana y que lo exporte activamente al medio extracelular, sin permitir el alcance del fármaco a su sitio blanco. (Becerra, 2009)

Las bombas de expulsión de antimicrobianos son proteínas de la membrana citoplásmica que consiguen eliminar al medio externo los antibióticos que han alcanzado el interior de la bacteria mediante un proceso activo (dependiente de energía). (Martínez, 2006)

Los genes de las bombas de expulsión están presentes en todos los organismos. En las bacterias, los genes que codifican las bombas de expulsión se localizan en el cromosoma y en los plásmidos. (Becerra, 2009)

En función de su estructura, se distinguen 5 grandes familias, habitualmente denominadas por sus iniciales en inglés: MFS (major facilitator superfamily), SMR (small Multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-division), MATE (multidrug and toxin extrusion) y ABC (ATP-binding cassette). Las 4 primeras familias adquieren energía de la fuerza motriz de protones, mientras que la última lo hace a través de la hidrólisis del ATP. En cada uno de estos grupos hay decenas de proteínas diferentes. Hay bombas de corto espectro (las que eliminan tetraciclinas), o capaces de expulsar una amplia variedad de compuestos, llamadas por eso bombas de expulsión multifármaco. (Martínez, 2006)

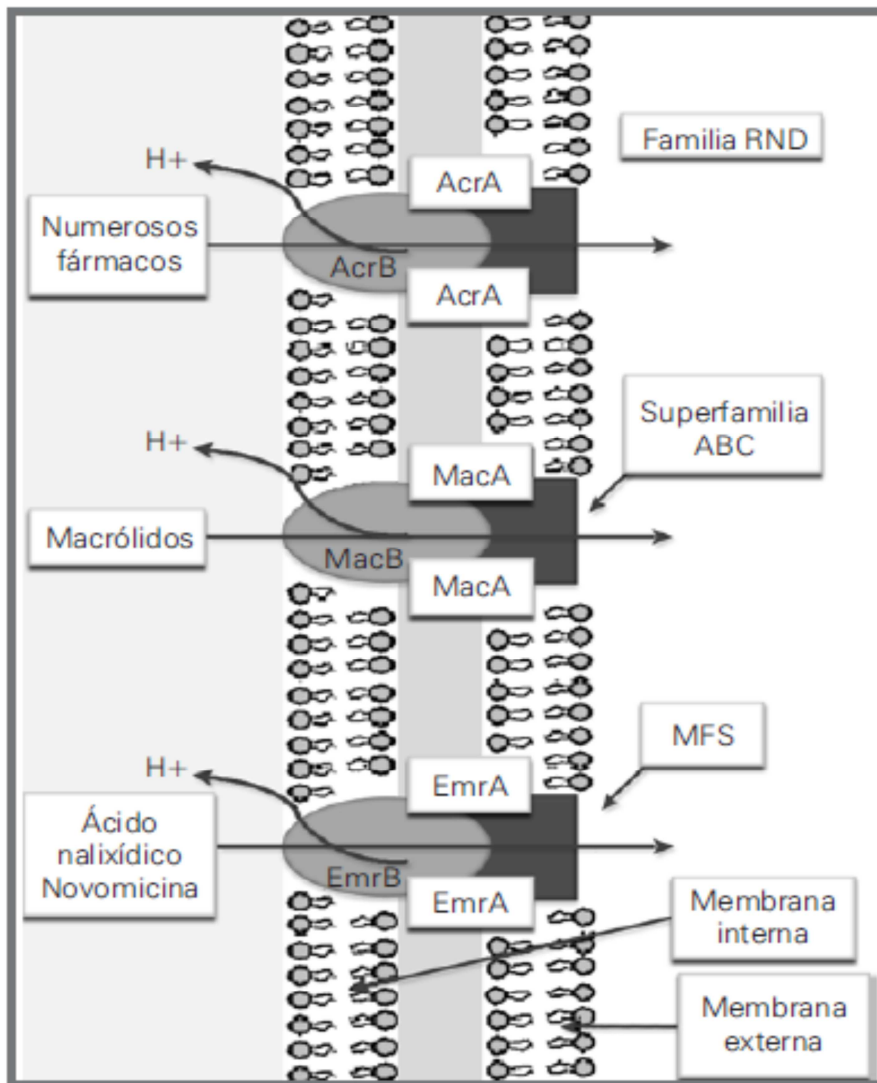


Figura 4. Bombas de expulsión en bacterias Gram negativas. Éstas poseen a las familias RND, ABC y MFS, además de presentar componentes proteínicos accesorios en la membrana externa, denominados TolC. (Becerra, 2009)

En bacterias Gram negativas, TolC puede funcionar como el conducto proteico para las diferentes bombas de expulsión de la familia RND, también pueden interactuar con transportadores MFS y la superfamilia ABC. (Martínez, 2006)

Algunos agentes antibacterianos no son útiles para el tratamiento de infecciones por algunas bacterias Gram negativas, pues éstas tienen resistencia intrínseca a estos agentes. Tal resistencia se atribuyó al principio a la baja permeabilidad de la membrana bacteriana al fármaco, lo cual ya se ha reportado e indica que la resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* a varios antibióticos se debe a bombas de expulsión.

En los seres humanos, *Pseudomonas aeruginosa* causa varias infecciones oportunistas, como en la piel y en tejido blando en pacientes con quemaduras, y neumonía en individuos con fibrosis quística. *Pseudomonas aeruginosa* posee bombas de la familia RND MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN, cada una de las cuales puede exportar varios tipos de antibióticos, como cloranfenicol, fluoroquinolonas y tetraciclinas, aunque no todos los sistemas Mex se expresan constitutivamente. Estas bombas de expulsión, además, exportan otras sustancias, como acriflavina, bromuro de etidio y algunos solventes orgánicos. (Garza, 2009)

Los perfiles de fármacos sustrato de las bombas de expulsión de *Escherichia coli* AcrAB-TolC (familia RND) son los antibióticos cloranfenicol, fluoroquinolonas, antibióticos lipofílicos, betalactámicos, ácido nalidíxico, novobiocina, rifampicina y tetraciclina, así como acriflavina, bromuro de etidio, sales biliares, ácidos carboxílicos de cadena corta, SDS, Tritón X-100 y triclosán. El sistema ACrAB-Tolc encontrado en *Salmonella sp.* es muy similar a *Escherichia coli* y su sustrato incluye los antibióticos cloranfenicol, quinolonas y tetraciclinas, así como acriflavina, bromuro de etidio, sales biliares, SDS, Tritón X, ceftrimida y triclosán.

Un solo organismo puede expresar más de una familia de bombas de expulsión. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, pueden expresar más de un tipo de bombas de expulsión de la familia RND, las cuales se expresan en bacterias Gram negativas y se relacionan con multirresistencia clínicamente significativa. (Sánchez, 2007)

Algunas bombas de expulsión activa funcionan asociadas a otras proteínas celulares y forman complejos proteicos funcionales. Las bombas RND de bacterias Gram negativas se asocian a una proteína periplásmica que, a su vez, las conecta con otra proteína de la membrana externa, formadora de un conducto a través del cual se expulsa al antimicrobiano. Con frecuencia, los 3 genes de las bombas RND forman parte de un mismo operón. El grado de resistencia causado directamente por bombas de expulsión suele ser moderado, pero la expresión de múltiples bombas en una misma bacteria y su asociación con otros mecanismos de resistencia contribuyen a la trascendencia clínica de estos sistemas. (Garza, 2009)

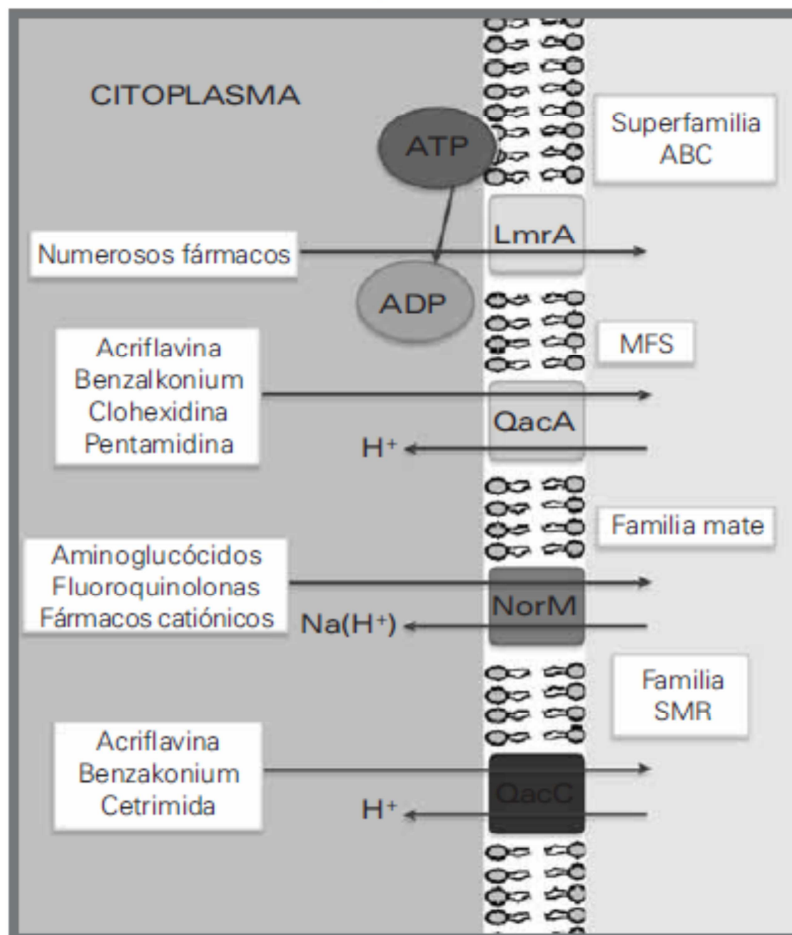


Figura 5. Representación de las bombas de expulsión en bacterias Gram positivas, estas poseen las bombas de las familias ABC, MFS, MATE y SMR. (Becerra, 2009)

Entre las bacterias Gram positivas que expresan bombas de expulsión clínicamente relevantes se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. La sobreexpresión de bombas de expulsión NorA (familia MFS) en *Staphylococcus aureus* confiere resistencia a cloranfenicol y fluoroquinolonas, así como pigmentos y biocidas, como cetrimida. De los antibióticos utilizados para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* susceptibles y resistentes a metilicina, sólo fluoroquinolonas y ciprofloxacino son sustratos de NorA.

Streptococcus pneumoniae causa neumonía, bronquitis y meningitis y algunas infecciones pueden ser fatales en la población joven. El tratamiento implica la administración de antibióticos betalactámicos, fluoroquinolonas o macrólidos. La bomba de expulsión PmrA (familia MFS) de *Streptococcus pneumoniae* exporta fluoroquinolonas, ciprofloxacino y norfloxacino, así como también el pigmento acriflavina y bromuro de etidio. Además de las bombas de expulsión MFS, *Streptococcus pneumoniae* expresa otras de la familia ABC, como Mel, y ambos pueden conferir resistencia a macrólidos, problema de preocupación mundial. (Martínez, 2006)

Las bombas de expulsión son el mecanismo de sospecha de la resistencia antimicrobiana cuando se incrementa la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres o más antibióticos para una bacteria en particular, en comparación con la CMI de estos antibióticos frente a la cepa nativa. La CMI de estos agentes antimicrobianos para la bomba de expulsión mutante puede ser de dos a ocho veces más alta que la CMI de estos agentes para la cepa susceptible. Cuando el CMI se incrementa más de 100 veces, por lo general se asocia con cualquier expresión de enzimas que inactive agentes antimicrobianos. (Garza, 2009)

2.3.1.2 RESISTENCIA ADAPTATIVA

En contraste con la resistencia natural que resulta de mutaciones de genes propios de la bacteria o adquiridos de manera externa, la adaptativa es sobre todo fenotípica, aunque algunos factores genéticos predisponen al microorganismo a activar este mecanismo. (Becerra, 2009)

2.3.1.2.1 INDIFERENCIA AL FÁRMACO

Las bacterias que no se están dividiendo no son eliminadas por los fármacos. Este fenómeno, que Walsh McDermott denominó “indiferencia al fármaco”, no se limita a la familia de antibióticos betalactámicos.

Las bacterias que no se dividen, y/o no tienen suficientes nutrientes para un metabolismo activo, son parcial o completamente resistentes a antibióticos bactericidas.

Este efecto resistente no-replicante, en subpoblaciones genéticamente susceptibles de bacterias a tratamiento con antibióticos, es particularmente bien conocido para el tratamiento de infecciones con *Mycobacterium tuberculosis*. Esta “latencia” es la razón primaria para la larga duración del tratamiento contra tuberculosis, lo que se conoce como “curso corto”. Las poblaciones residuales y “latentes” de bacterias sin división pueden contribuir a recaídas tras la suspensión del tratamiento antibiótico para infecciones micobacterianas, estafilocócicas y otras. (Garza, 2009)

2.3.1.2.2 PERSISTENCIA

Es conocido que los antibióticos bactericidas no eliminan todas las bacterias aun en crecimiento activo.

Conforme pasa el tiempo, el rango de eliminación declina en fracción sustancial de la población bacteriana que sobrevive al encuentro con ese fármaco. Este fenómeno se denomina persistencia bacteriana, resistencia adaptativa o tolerancia fenotípica.

La razón por la cual la subpoblación persistente puede sobrevivir a la exposición de antibióticos parece ser la misma condición que la población a la cual le es indiferente el fármaco: las células bacterianas no estaban en replicación al momento de su exposición al fármaco.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar por qué deja de replicarse un subconjunto de bacterias (SOS systems) y así adopta el fenotipo de resistencia.

Otro mecanismo sería que, durante el curso de crecimiento, las poblaciones bacterianas incluyen células en proceso de reparación de su ADN y que no se están dividiendo, lo que generaría un fenotipo resistente. (Jasovich, 2003)

2.3.1.2.3 BIOPELÍCULAS

Aunque los genes de resistencia y sus productos son los principales mecanismos de resistencia a antibióticos existen otros menos explorados, como el relacionado con la producción de biopelículas.

Las biopelículas son agregados adherentes que se forman en superficies bióticas o abióticas. Se ha demostrado que las cepas que producen biopelículas son significativamente más resistentes a antibióticos y agresores antimicrobianos, incluso con respuesta del hospedero. Esta forma de crecimiento bacteriano contiene células genéticamente sensibles, refractarias a muchos antibióticos, pero no a todos. (Hart, 2001)

Se han propuesto tres mecanismos por los cuales las biopelículas contribuyen a la resistencia. Primero, se postuló que las células bacterianas encajadas en matrices de polisacáridos que constituyen la biopelícula son menos accesibles a la difusión del antibiótico. La segunda razón es que se trata de una forma de indiferencia al fármaco a causa de los nutrientes y otros limitantes, pues muchas células bacterianas dentro de la biopelícula no se replican ni metabolizan lo suficiente para que el antibiótico funcione de manera eficaz. La tercera hipótesis, y actualmente la más apoyada, es que las bacterias dentro de las biopelículas se diferencian a estados refractarios a los antibióticos; es decir, una combinación de indiferencia y persistencia, factores ya comentados.

Esto debe considerarse en el tratamiento. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* produce biopelículas donde los antibióticos, como las fluoroquinolonas, penetran más fácilmente en comparación con los aminoglucósidos, pues éstos se unen a polímeros como el alginato, además de considerar interacciones muy importantes, como la de los aminoglucósidos como inductores de la formación de biopelículas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, lo que exacerba la resistencia. (Martínez, 2006)

2.3.2 RESISTENCIA A LOS PRINCIPALES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS

BETALACTÁMICOS

La resistencia que desarrollan las bacterias frente a los betalactámicos representa un grave problema, pues es probablemente el grupo de antibióticos más utilizado. Las bacterias desarrollan al menos tres mecanismos para hacerse resistentes a ellos, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de las enzimas blanco (PBPs), alteración de la membrana externa y producción de enzimas inactivantes (betalactamasas).

Las PBPs son necesarias para que la bacteria forme su pared celular, y los antibióticos betalactámicos se fijan en estas enzimas impidiéndolo. Si la bacteria modifica sus PBPs de modo que no fijen el antibiótico, se hará resistente; otros mecanismos serían la hiperproducción o la adquisición de PBPs resistentes. La resistencia a metilina en estafilococos, a betalactámicos en neumococo y enterococos y en algunas bacterias Gram negativas, pueden ser debidas a alteraciones de PBPs.

La modificación de la membrana externa, cuando es el único mecanismo implicado no suele ser importante, pero sí cuando se asocia a la producción de betalactamasas, siendo especialmente decisiva en los Gram negativos, pues los betalactámicos entran a través de las porinas, que al modificarse o desaparecer pueden causar resistencia.

La producción de enzimas inactivantes, es sin duda el mecanismo más importante de los betalactámicos ya que la adquisición de betalactamasas (plasmídicas o cromosómicas), es la causa más frecuente de resistencia.

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos y dan lugar a su inactivación. Su clasificación se basa en sus propiedades bioquímicas, estructura molecular y secuencia de aminoácidos, que se agrupan en cuatro clases, A, B, C y D. Dentro de la clase A existen dos familias principales de β -lactamasas denominadas TEM-1 (contracción de Temoniera, el nombre de un paciente de cuya bacteria resistente se aisló) y SHV-1 (sulphydryl variable, una descripción de propiedades bioquímicas de esta β -lactamasa). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar sólo a penicilinas; pero, en virtud del uso de las cefalosporinas, se han seleccionado bacterias que contienen β -lactamasas mutadas en uno a tres residuos cercanos al sitio activo de la enzima con la capacidad de reconocer e hidrolizar a estos nuevos sustratos. Dichas enzimas se denominan β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). (Sánchez, 2007)

AMINOGLUCÓSIDOS

La inactivación enzimática mediada por plásmidos representa el principal mecanismo de resistencia en enterobacterias, estafilococos y enterococos, pero existen otros mecanismos como alteraciones en la permeabilidad de la membrana y/o mutaciones cromosómicas. Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos.

MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS

Estos grupos de antibióticos por ser hidrofóbicos atraviesan fácilmente la membrana externa por lo que los bacilos Gram negativos presentan resistencia natural, aunque modificaciones en las nuevas moléculas como azitromicina parecen disminuir este hecho. (Martínez, 2006)

QUINOLONAS

La resistencia está relacionada con el blanco principal de acción, la topoisomerasa II o girasa y fundamentalmente en la subunidad A del ribosoma. No obstante cada vez se da más importancia a la presencia de mecanismos de expulsión que impiden alcanzar concentraciones intracelulares de antibiótico suficientes o dificultan el paso a través de la pared. (Sánchez, 2007)

TETRACICLINAS

Aunque existe resistencia por modificación enzimática codificada por transposones, el mecanismo de resistencia más importante en enterobacterias es por expulsión activa y en Gram positivos y en algunos Gram negativos como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Campylobacter* y *Bacteroides*, por producción de proteínas citoplásmicas que impiden la unión de la molécula al ribosoma. (Martínez, 2006)

CLORANFENICOL

La modificación enzimática (por codificación plasmídica o cromosómica) es el mecanismo de resistencia principal, aunque también se han detectado cambios en la permeabilidad de la membrana externa. (Embid, 2005)

2.3.3 RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS ¿PROBLEMA CLÍNICO O TAMBIÉN ECOLÓGICO?

Desde mediados de la década de 1990, y muy especialmente en los últimos años, los científicos han comenzado a tomar conciencia sobre una nueva dimensión del problema de la resistencia a los antibióticos.

Como sabemos, la resistencia no afecta solo a las bacterias patógenas de interés clínico, que se aíslan a partir de procesos infecciosos en el hombre y en los animales, sino que afecta también a las bacterias comensales (no patógenas), que forman parte de la microbiota de humanos y animales (especialmente de la intestinal) y de otros ecosistemas (alimentos, agua, suelo, etc) y que se ven expuestas al uso masivo de los antibióticos en los distintos ámbitos. Además, algunos mecanismos de resistencia altamente preocupantes podrían haber surgido en ecosistemas naturales y, posteriormente, podrían haber pasado al ambiente hospitalario. (Torres, 2012)

Existe un continuo flujo e intercambio de bacterias resistentes y de genes de resistencia entre los diferentes ecosistemas (humano, animal, acuático, terrestre, etc). Por otro lado, con mucha frecuencia, las personas y los animales viajan, a veces a sitios muy lejanos, con lo que la posibilidad de intercambio de bacterias resistentes y de genes de resistencia se amplifica enormemente. Estamos en un mundo globalizado y la resistencia a los antibióticos no escapa a este concepto. Esto abre la posibilidad de aproximarse al estudio de la resistencia de los antibióticos desde una nueva dimensión: la ecológica. (Jasovich, 2003)

Hace unos años el interés de la comunidad científica se centraba básicamente en la realización de programas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas aisladas en procesos infecciosos en humanos o animales, pero en la actualidad, la situación ha cambiado.

Existe un enorme interés en el ámbito internacional por la realización de programas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos en bacterias tanto patógenas como comensales de los más diversos ecosistemas (animal, humano, alimentario, ambiente), con el objetivo de conocer de forma global el grado de diseminación de las bacterias resistentes y de los mecanismos de resistencia, y así poder predecir su evolución y establecer estrategias para su control.

En estos programas de vigilancia es crucial seleccionar bacterias que estén muy diseminadas en muchos ecosistemas y que puedan actuar tanto como comensales como patógenas, para de este modo analizar la presión selectiva de los antibióticos en los distintos ambientes. Las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* cumplen los requisitos anteriormente mencionados y además son representantes de los dos grandes grupos de bacterias que conocemos, Gram negativas y Gram positivas, respectivamente. Por ello, estos dos tipos de bacterias son excelentes candidatos para los estudios de vigilancia, y son considerados como bacterias “centinelas de la resistencia”. (García, 2001)

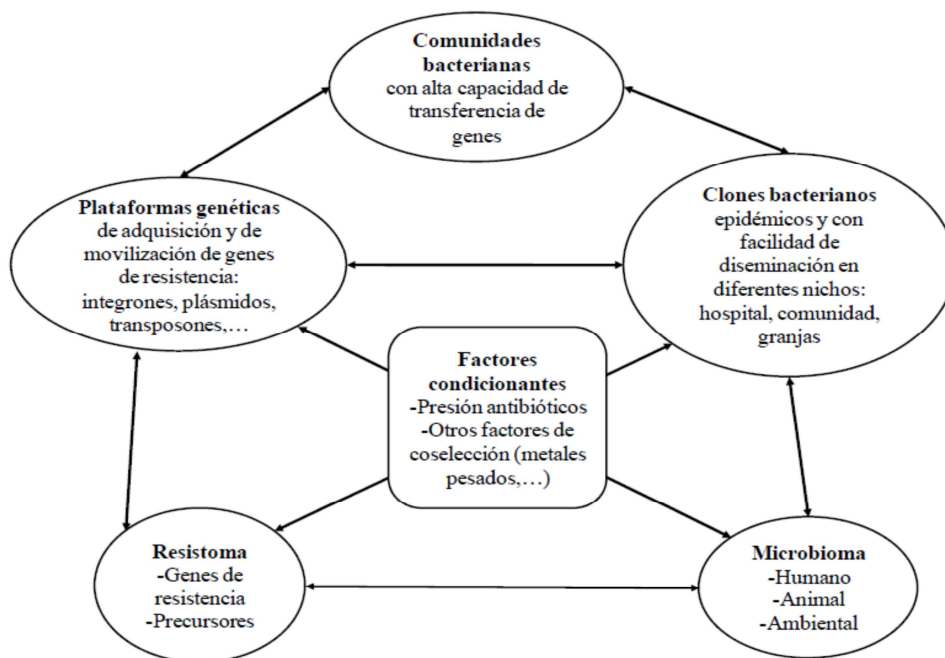


Figura 6. La resistencia a los antibióticos y la complejidad de factores implicados en su emergencia, diseminación y evolución. (Jasovich, 2003)

2.3.4 ESTRATEGIAS PARA ABORDAR EL PROBLEMA DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Ante el grave problema clínico originado por el alarmante incremento de la resistencia a los antibióticos, ¿qué estrategias se pueden llevar a cabo?.

- 1) En primer lugar, es fundamental abordar la resistencia a los antibióticos como un problema global, tanto por los ámbitos profesionales que se ven involucrados, como los nichos ecológicos que se ven afectados, como también por su dispersión mundial. Por ello, se requiere un abordaje multidisciplinario del problema, a escala internacional, que implique a los responsables del uso de los antibióticos en medicina y veterinaria, las autoridades sanitarias, los científicos, la industria farmacéutica y los propios pacientes. Por otro lado, cada vez es más claro que en el tema de la resistencia bacteriana a los antibióticos no existen barreras, ni de especie, ni de nicho, ni geográficas, por lo que el abordaje debe ser a nivel mundial.

- 2) Es necesario llevar a cabo Programas de Vigilancia de la resistencia a los antibióticos en bacterias de origen humano y animal e incluso ambiental y, asimismo, controlar la diseminación de clones bacterianos epidémicos que puedan propagarse en diferentes nichos y que puedan tener implicaciones en salud pública. El uso de las nuevas tecnologías de epidemiología molecular serán de gran utilidad en este campo. Por otro lado, extremar las medidas de higiene en todos los ámbitos es un aspecto de enorme importancia para evitar la propagación de bacterias resistentes.

- 3) Es fundamental el diseño de políticas adecuadas de uso prudente de antibióticos tanto en medicina humana como en veterinaria. Uso prudente no significa sólo reducción en el consumo de antibióticos sino también prevención en el mal uso o sobreuso de los mismos y un buen diagnóstico de las infecciones para poder adoptar las terapias más adecuadas.

- 4) Llevar a cabo programas de concienciación a todos los niveles (sector sanitario, pacientes, etc) sobre el problema de la resistencia a los antibióticos y las implicaciones de su mal uso. En este sentido, desde el año 2006 se han estado realizando campañas de concienciación en países de la Unión Europea.

- 5) Promover la investigación en diversos campos. En primer lugar en el desarrollo de nuevos antibióticos, especialmente enfocados a las bacterias Gram negativas multirresistentes que están suponiendo un verdadero problema clínico y frente a las cuales hay, actualmente, escasas alternativas terapéuticas. Es importante, asimismo, la investigación en nuevos tratamientos “no antibióticos”, mediante el uso de probióticos, péptidos antimicrobianos, o fagos, entre otros. Por otro lado, es fundamental la investigación en nuevas estrategias de tratamiento y dosificaciones de antibióticos en humanos y en animales, que minimicen la selección de resistencia y en programas de control de la infección para evitar la propagación de clones bacterianos multiresistentes en el ámbito humano y animal. El avance en otros aspectos como las vacunas, especialmente en veterinaria, puede contribuir asimismo a reducir el uso de estos fármacos. (Maguiña, 2006)

2.4 LA PIEL DEL ADOLESCENTE

Durante la adolescencia, la piel no va a ser ajena a los cambios que se producen a esa edad, los cuales involucran aspectos hormonales que se producen en cuanto a la secreción de andrógenos, estrógenos y glucocorticoides, que van a actuar en el folículo pilo-sebáceo, en la proliferación de los queratinocitos y en la glándula sebácea y en epidermis, anejos y dermis, respectivamente. Durante esta etapa las influencias hormonales generan manifestaciones en ella. Por ejemplo, las glándulas sebáceas de la piel que producen el sebo, necesario para la protección, lubricación y retención de la humedad de la piel, varían su tamaño, cantidad y calidad en la producción de sebo. El funcionamiento exagerado de estas glándulas provoca un estado de exceso de grasa, muy común en la adolescencia. (Veiga, 2010)

La producción de sebo es continua y responde básica, pero no exclusivamente, a los estímulos androgénicos. Los cambios en el crecimiento y distribución de pelo serán intensos y variarán el aspecto externo del joven adolescente. Otras glándulas de la piel joven que se activan justo antes de la pubertad son las glándulas sudoríparas apocrinas localizadas en axilas, areolas mamarias, región ano-genital, periumbilical, y a veces en cara y cuero cabelludo. Se presume que su desarrollo está asociado a los cambios hormonales y su secreción responde a estímulos emocionales. (Ponchner, 2009)

Ante estos cambios la actitud de los jóvenes con el cuidado de la piel es variada. Al principio, en la adolescencia, que es un periodo de cambio y de rebeldía, muchos jóvenes presentan una actitud transgresora dejando a un lado incluso los hábitos higiénicos básicos y los hábitos de prevención del cáncer de piel. En el lado opuesto, otros se interesan excesivamente por el cuidado de su imagen, se inician en la utilización de cosméticos de todo tipo que, la mayoría de las veces, no son los adecuados para su tipo de piel. (Vázquez, 2012)

2.4.1 LA PIEL: UN HÁBITAT PARA ALGUNOS MICROORGANISMOS

La salud de la piel, el órgano que funciona como primera línea de defensa contra las infecciones y heridas, depende de un equilibrio delicado entre las células que la componen y los millones de bacterias y otros microorganismos que habitan en ella. (Ponchner, 2009)

Se denomina microbiota normal o biota nativa al conjunto de microorganismos que viven de forma habitual en un cuerpo sano. Los lugares donde se encuentran pueden ser muy variados y en ellos desarrollan tareas beneficiosas para el ecosistema general del cuerpo. Estas tareas incluyen la participación en los procesos de digestión de alimentos y de síntesis de vitaminas en el intestino, la producción del pH ácido de la vagina o la protección competitiva frente a patógenos. Por consiguiente, en la mayoría de los casos, la interacción entre la biota normal y el ser humano es beneficiosa; pero pueden producirse circunstancias en que esto cambie y la flora normal se torne patógena oportunista. (Mosby, 2005)

La biota normal se adquiere con rapidez durante y poco después del nacimiento, y cambia de forma continua durante el crecimiento. Refleja la edad, la nutrición y medio ambiente del individuo. Por ejemplo, los lactantes que son alimentados del pecho de la madre tienen estreptococos y lactobacilos en su tracto gastrointestinal, mientras que los que son alimentados con biberón muestran una variedad mucho mayor de microorganismos. (Kenneth, 2007)

Los tratamientos con antibióticos de amplio espectro o la acción antiséptica de algunos productos de limpieza (jabones, por ejemplo) pueden alterar la flora normal lo que, en ocasiones, deja la puerta abierta para el desarrollo de procesos infecciosos oportunistas que pueden llegar a ser graves. (Mosby, 2005)

Los antibióticos causan una reducción drástica de la biota normal y como consecuencia el huésped puede, quizá, ser infectado por patógenos nuevos o por crecimiento excesivo de microorganismos presentes normalmente en número pequeño. Por ejemplo: la proliferación de *Clostridium difficile* que sobreviene al tratamiento con clindamicina y que ocasiona colitis pseudomembranosa. Aunque la piel está expuesta al contacto con un gran número de microorganismos, la mayoría de ellos no puede crecer sobre ella debido a la sequedad y a la baja actividad de agua (aw) de las secreciones de sudor. (Ponchner, 2009)

Los microorganismos de la piel son generalmente Gram positivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*) que son, además, más resistentes a agentes antisépticos. Se encuentran en menor proporción Gram negativos (*Pseudomonas*) y bacterias entéricas. También pueden encontrarse algunas levaduras y hongos productores de tiña. (Kenneth, 2007)

En el año 2006 un equipo de investigadores de los Institutos de Salud de Estados Unidos se dio a la tarea de dilucidar el microbioma de la piel: los genomas de todos los microorganismos presentes en la epidermis. Para esto, diez voluntarios saludables dejaron que los investigadores tomaran muestras de su piel de 20 distintos puntos de su cuerpo.

Los científicos las analizaron y hallaron 112,000 secuencias genéticas bacterianas distintas pertenecientes a 19 filos y 225 géneros, una diversidad inesperada, según señalan en su publicación de la revista Science. Determinaron que el sitio de la piel con más variedad bacteriana es el antebrazo, con 44 especies distintas en promedio, mientras que el que presenta menos variedad se ubica detrás de la oreja, donde, los científicos hallaron una media de 19 especies distintas de microorganismos. (Ponchner, 2009)

De igual forma pudieron concluir que de persona a persona el ecosistema bacteriano de la piel no varía mucho. Los científicos hallaron, por ejemplo, más diferencias microbianas entre el antebrazo y la parte de atrás de la rodilla (fosa poplítea) de una misma persona, que entre los antebrazos de dos individuos distintos. (Ponchner, 2009)

Dado que la mayoría de las infecciones nosocomiales son transmisibles por las manos, el lavado de las manos es una práctica de gran importancia en el control de estas infecciones y es una de las prácticas más descuidadas por el personal sanitario. La biota nativa de las manos está compuesta por microorganismos transeúntes y microorganismos residentes.

Al primer grupo pertenece la mayoría de los microorganismos patógenos. Se trata de microorganismos que se quedan en nuestra piel durante poco tiempo y son fácilmente eliminados por lavado. Llegan a nosotros a través del contacto con material o instrumental contaminado. Los microorganismos residentes son habitantes habituales de la piel y, en general, son de baja virulencia por lo que no suelen ser peligrosos. Es más difícil eliminarlos por lavado. Incluyen diferentes tipos de estafilococos, corinebacterias y coliformes.

En ciertas ocasiones es necesario eliminar ambos tipos de biota normal (operaciones quirúrgicas, tratamiento de pacientes con inmunodepresiones severas). Se ha comprobado que un número significativo de pacientes con catéteres arteriales (1%) o venosos (7%) llegan a tener bacteremias causadas por microorganismos de la piel que acceden al interior del paciente a través de la herida de inserción del catéter. (Segre, 2006)

Por otro lado, es importante mencionar la utilización de los productos higiénicos, los cuáles contienen químicos que son absorbidos por la piel. Acto seguido ingresan en el torrente sanguíneo, lo que permite la distribución de las toxinas por todo el cuerpo.

Se debe evitar el uso de jabones antibacterianos, que también son causa de baja inmunidad en la piel, lo que posibilita la proliferación de hongos y bacterias. Los jabones antibacterianos (así como champús, detergentes y numerosos productos de limpieza) contienen triclosán, un químico que no sólo mata las bacterias, sino que también destruye las células de la piel.

Los jabones antibacterianos debilitan el sistema inmunológico en general (no sólo en la piel) al interferir en el proceso de maduración de las células T, aumentando el riesgo de alergias en niños.

Recientemente se ha descubierto que los productos antibacterianos ofrecen muy poca protección contra la mayoría de los microorganismos y, por si fuera poco, están incrementando la resistencia de las bacterias a la acción de los antibióticos. (Kenneth, 2007)

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de bacterias cultivables multirresistentes a antibióticos en piel de 10 adolescentes sanos de 13 y 15 años de edad.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar 5 zonas del cuerpo humano que caractericen diversas condiciones de la piel.
- Mediante un método no invasivo, asilar bacterias provenientes de las 5 zonas del cuerpo previamente seleccionadas, para seleccionar aquellas que resulten ser resistentes a los antibióticos.
- Caracterizar e identificar las bacterias cultivables multirresistentes a antibióticos que existen en la piel de adolescentes sanos.

4. HIPÓTESIS

Existen bacterias multirresistentes a antibióticos en la piel sana de adolescentes asintomáticos y que no han recibido terapia con antibióticos por lo menos durante los 6 meses previos al estudio.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Toma de muestra.

2. Incubación de muestras a 37 °C por 24 horas y posterior resiembra en caldo BHI.

3. Siembra de muestras en caldo BHI + antibiótico.

4. Siembra y aislamiento en agar MSA y agar McConkey.

5. Tinción de Gram y observaciones al microscopio.

6. Antibiograma

7. Replica plating

8. Pruebas bioquímicas

9. Prueba de bromuro de etidio

5.1 TOMA DE MUESTRAS

Para la obtención de las muestras se eligió un método no invasivo, para lo cual se utilizaron hisopos estériles y se realizaron frotis de la piel sana de los 10 adolescentes asintomáticos de 13 y 15 años de edad.

El proceso que se siguió fue el siguiente: se humedeció un hisopo estéril en solución salina isotónica al 0.9% también estéril, utilizando una lámpara de alcohol, cubrebocas, cofia y un par de guantes (cabe señalar que los guantes se renovaban para el muestreo de cada individuo) para así lograr tener las mejores condiciones asépticas y evitar una posible contaminación de muestras. Se tomó la muestra a cada individuo de las cinco zonas del cuerpo elegidas: pliegue alar (zona A), ombligo (zona B), palma de la mano cerca del meñique (zona C), fosa poplítea (zona D) y conducto auricular externo (zona E), una vez obtenida la muestra, se colocó el hisopo en un tubo de ensaye de 13x100 con medio estéril BHI.

5.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidas las 50 muestras, se incubaron a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una resiembra, utilizando una micropipeta se tomaron 100 µL de muestra y se colocaron en 3 mL de caldo BHI incubándose en las mismas condiciones.

Para seleccionar a las bacterias resistentes a antibióticos, se utilizó caldo BHI con antibiótico, para esto se eligieron cuatro antibióticos utilizando su concentración mínima inhibitoria, dichos antibióticos fueron: ceftriaxona (64 µg/mL), cefotaxima (32 µg/mL), dicloxacilina (32 µg/mL) y ampicilina (32 µg/mL).

Se colocaron 3 mL del medio con antibióticos en tubos de ensaye de 13x100 (50 tubos por cada antibiótico, por lo tanto se tuvo un total de 200 tubos) y después se colocaron 100 μ L de muestra en cada uno de los tubos, posteriormente se incubaron todas las muestras a 37°C por 24 h.

5.2.1 AISLAMIENTO EN MEDIO MSA Y McCONKEY

Después de transcurrido el tiempo de incubación, el objetivo fue seleccionar sólo aquellas muestras en las que existía crecimiento, es decir se seleccionaron aquellas que presentaban resistencia a los antibióticos; sin embargo cabe señalar que las 50 muestras presentaron resistencia a los antibióticos probados.

Se prepararon cajas Petri con medios de cultivo diferenciales MSA y McConkey con el objetivo de aislar los dos grandes grupos Gram positivos y Gram negativos. Cada muestra se sembró por la técnica estría radial para la obtención de colonias aisladas, incubándose a 37°C de 24 a 48 h.

Finalizado el tiempo de incubación, se observó que en varias de las cajas había más de dos tipos de colonias diferentes y en algunas se presentó vire del medio. Se realizaron observaciones al microscopio, utilizando tinción de Gram, esto con el objetivo de verificar que el cultivo se encontraba puro. Cuando se observaba que el cultivo aún no estaba puro se realizaron resiembras en caldo BHI, posteriormente en los medios MSA y McConkey y nuevamente tinciones de Gram hasta lograr el objetivo.

Finalmente en esta etapa se contó con muestras puras que se sembraron nuevamente en caldo BHI, incubándose a 37°C por 24 h.

5.2.2 ANTIBIOGRAMA

La realización de los antibiogramas fue con la finalidad de determinar si existía multirresistencia bacteriana a los antibióticos. En esta etapa el medio utilizado fue agar Mueller Hinton, además de que se utilizaron sensidiscos que contenían 12 diferentes antibióticos tanto para Gram positivos como para Gram negativos. Se sembraron cada una de las muestras por la técnica extendido en placa con la ayuda de una varilla de vidrio (esterilizada con alcohol) y se colocó el sensidisco. Todas las muestras se incubaron a 37°C por 24 h.

Cuando finalizó el tiempo de incubación, se observaron las cajas para ver si se presentaban o no halos de inhibición. Con base a estos resultados, para realizar la prueba siguiente, se seleccionaron solo aquellas cepas que presentaron multirresistencia; sin embargo nuevamente todas las cepas resultaron multiresistentes.

5.2.3 REPLICA PLATING

Para esta técnica se tomó 1 µL de cepa y se inoculó en 10 mL de solución salina isotónica estéril y se incubaron a temperatura ambiente. Se prepararon cajas Petri con medio Mueller Hinton y se sembró cada cepa por la técnica extendido en placa con una varilla de vidrio (esterilizada con alcohol) y se incubaron a 37°C por 24 h.

Cuando transcurría el tiempo de incubación, se preparó el doble número de cajas utilizadas con agar Mueller Hinton más antibiótico, para esto se utilizaron dos antibióticos, seleccionando así el antibiótico al que se presentó mayor porcentaje de resistencia (ampicilina) y el antibiótico al que se presentó menor porcentaje de resistencia (ceftriaxona).

Transcurrido el tiempo de incubación de las cajas, se contaron las colonias de cada una de ellas, utilizando el método de conteo dilución en placa. Posteriormente se procedió a realizar la técnica replica plating para cada una de las cepas, la cual consistió en lo siguiente: se colocó un paño de terciopelo estéril sobre una base cilíndrica de metal, con un diámetro ligeramente menor que el diámetro de la caja Petri, el paño se detuvo a la base con la ayuda de un anillo de acero inoxidable. Después se invirtió la caja que contiene las colonias bacterianas sobre el paño de terciopelo y se presionó suavemente sobre este; las fibras del terciopelo, miles por centímetro cuadrado, actúan como si fuesen agujas de inoculación, tomando una muestra de cada colonia que está en la caja. Luego se retiró la caja Petri y se presionó la caja con ampicilina, con el fin de recibir el inóculo de cada una de las colonias. Como el inóculo de la superficie del terciopelo era suficientemente grande, permitió imprimir la caja con ceftriaxona, y este procedimiento se realizó sucesivamente con todas las cepas.

Teniendo todas las cajas listas después de la réplica, se incubaron a 37° C por 24 h y transcurrido el tiempo se contabilizaron las colonias de las cajas con antibiótico, para lograr obtener el porcentaje de resistencia que se presentaba a cada antibiótico probado.

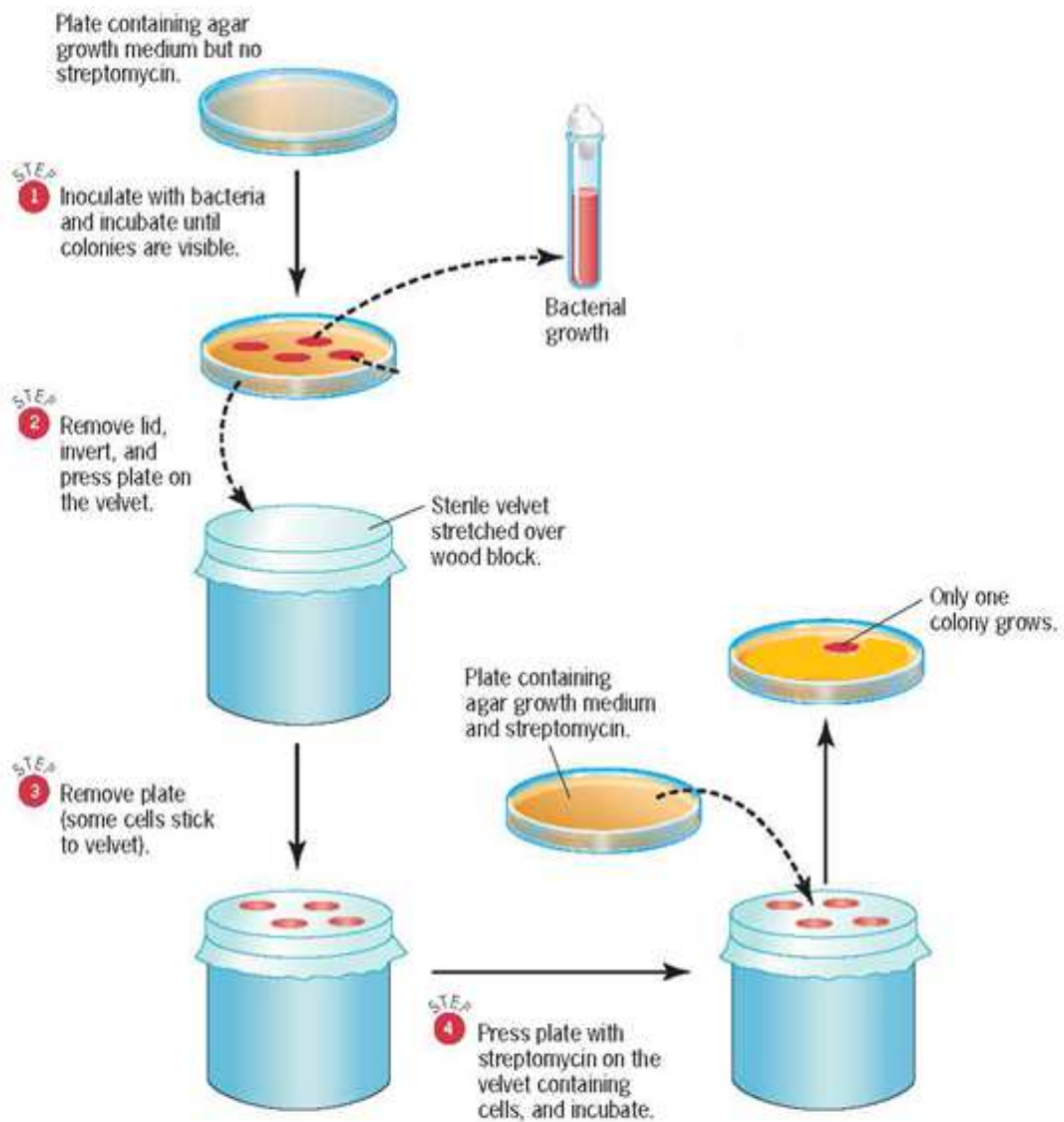


Figura 7. Esquema sobre cómo se lleva a cabo la técnica Replica plating (Millanao, 2011).

5.2.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación y caracterización de las bacterias multirresistentes. Para el grupo de los Gram positivos se realizaron las pruebas de la catalasa, coagulasa y manitol y para el grupo de los Gram negativos se realizaron las pruebas de la oxidasa y la siembra en los medios KIA, CITRATO DE SIMMONS, SIM, VP, MIO y OF incubando los tubos a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo se realizó la interpretación de resultados de las pruebas.

5.2.5 PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO

Para esta prueba se seleccionaron cepas de bacterias Gram positivas que presentaron mayor porcentaje de multirresistencia bacteriana a los antibióticos y que representaban una de las zonas del cuerpo humano estudiadas.

Cada una de las cepas seleccionadas 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.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

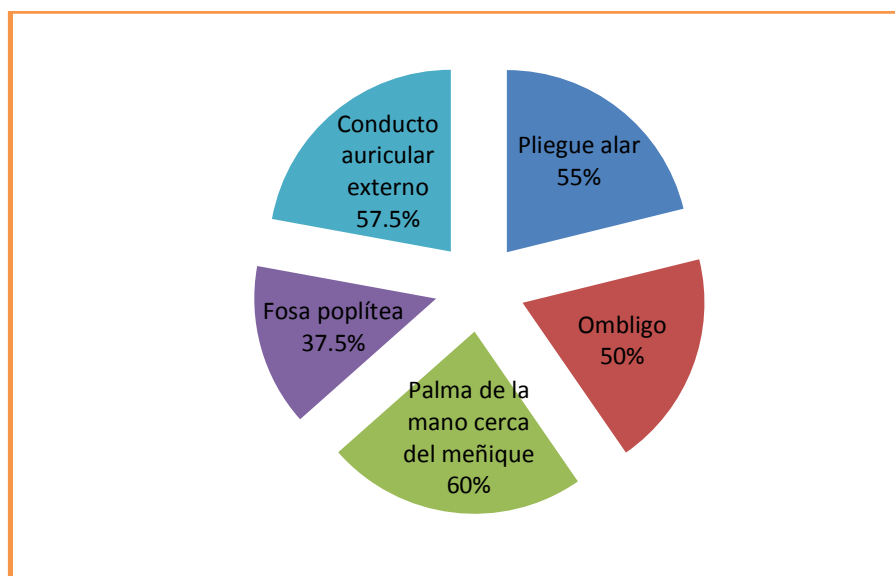
6.1 RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Tabla 2. Porcentaje de resistencia bacteriana por zona de las 50 muestras totales que corresponden a los 10 voluntarios sanos.

ZONA	CEFTRIAXONA	AMPICILINA	CEFOTAXIMA	DICLOXACILINA
A	40.00%	80.00%	50.00%	50.00%
B	30.00%	70.00%	40.00%	60.00%
C	20.00%	90.00%	70.00%	60.00%
D	30.00%	70.00%	30.00%	20.00%
E	40.00%	90.00%	60.00%	40.00%

Pliegue alar (zona A, grasosa), ombligo (zona B, húmeda), palma de la mano cerca del meñique (zona C, seca), fosa poplítea (zona D, húmeda) y conducto auricular externo (zona E, grasosa).

6.2 FRECUENCIA RELATIVA DE RESISTENCIA BACTERIANA A LOS CUATRO ANTIBIÓTICOS PROBADOS



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 da como resultado 100%, ya que una misma bacteria puede ser resistente a más de un antibiótico.

En la tabla No. 2 se puede observar que el mayor porcentaje de resistencia bacteriana se presenta hacia la ampicilina y el menor porcentaje se presenta hacia la ceftriaxona. Por otro lado, cabe señalar que la zona en la que se presentó el mayor porcentaje de resistencia bacteriana fue la zona C que corresponde a la palma de la mano cerca del meñique con un 60%, seguida de la zona E correspondiente al conducto auricular externo y la zona A el pliegue alar con un 57.5 % y un 55%, respectivamente. La zona con el menor porcentaje de resistencia bacteriana fue la zona D correspondiente a la fosa poplítea con el 37.5%.

Estos resultados son de suma importancia, ya que se observa que las cinco zonas muestreadas presentan un porcentaje de resistencia bacteriana muy cercano, lo que nos indica que por la condición de la piel (húmeda, seca y grasosa) no hay una diferencia importante en cuanto al establecimiento de bacterias resistentes a los antibióticos. Comparativamente, los resultados arrojados del estudio realizado hace un año en este mismo laboratorio en piel sana de niños de 4 y 5 años de edad, en donde las dos zonas que presentaron el mayor porcentaje de resistencia bacteriana fueron la zona B correspondiente al ombligo y la zona E correspondiente al conducto auricular externo con el 45%, además de que no rebasaban el 50% de frecuencia relativa de resistencia bacteriana y los porcentajes no resultaron ser tan cercanos. Esta diferencia entre los resultados de los niños y los adolescentes puede deberse a varios factores como a los hábitos de higiene, a la producción de sudor y de sebo, a los cambios hormonales, al contacto con las personas, al aumento en la frecuencia del consumo de

medicamentos así como el aumento en las dosis utilizadas de estos, al uso de cremas corporales y al uso de cosméticos.

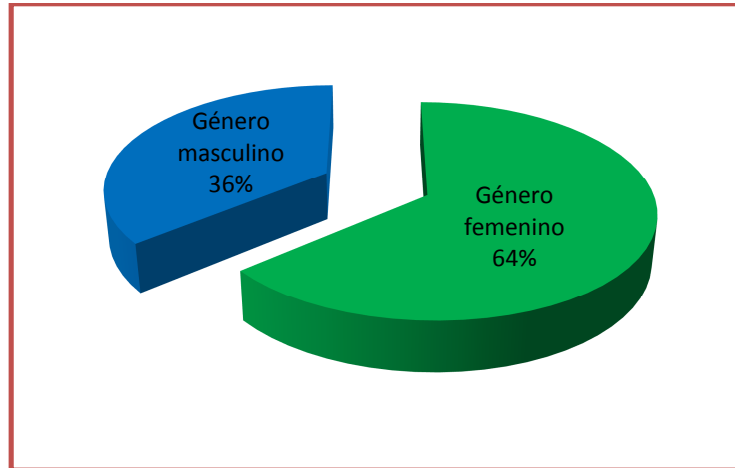
6.3 ANTIBIOGRAMA



En cuanto al antibiograma, los resultados obtenidos indicaron que las cepas presentaban multirresistencia a los antibióticos, debido a que presentaron resistencia mínimo a 8 y máximo hasta 12 antibióticos diferentes.

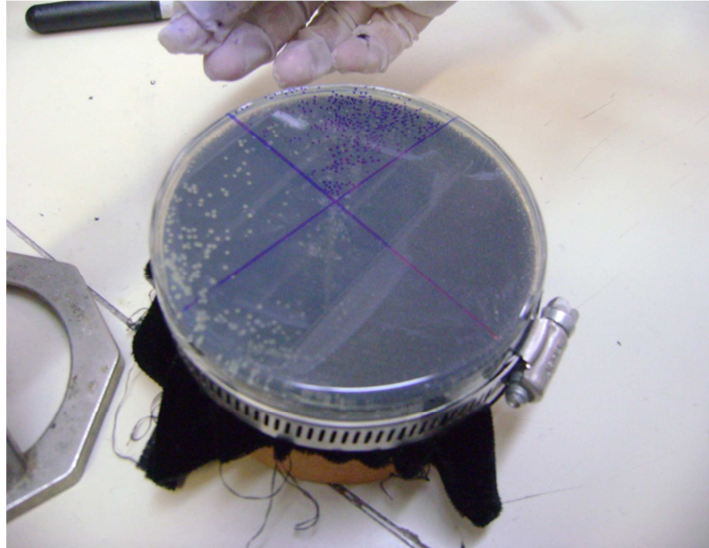
Esto puede deberse a que la bacteria sufre mutaciones, lo que la hace resistente a dos o tres antibióticos diferentes, lo cual ocasiona un costo genético y la resistencia a los demás antibióticos puede deberse al mecanismo de resistencia llamado bombas de expulsión o también puede deberse a que se están llevando a cabo varios mecanismos de resistencia como son: modificación del sitio blanco en el que el antibiótico ejerce su acción terapéutica para la cual fue diseñado, alteración de la permeabilidad de la membrana o inactivación del antibiótico por medio de enzimas.

6.4 DISTRIBUCIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN FUNCIÓN DEL GÉNERO



En cuanto a la distribución de resistencia a los antibióticos se observó que el género que presentó mayor porcentaje de resistencia bacteriana fue el género femenino como se ha reportado en la literatura (Segre, 2006) y también como se reportó en el estudio de piel sana de niños de 4 y 5 años, obteniendo un 56% de resistencia para el género femenino y un 44% para el género masculino.

6.5 REPLICA PLATING



Se llevó a cabo la replicación de la población de bacterias multirresistentes frente a 2 antibióticos, que se seleccionaron con base a la frecuencia de resistencia observada, es decir se seleccionó el antibiótico al que se presentó mayor porcentaje de resistencia (ampicilina) y el antibiótico al que se presentó menor porcentaje de resistencia (ceftriaxona).

	AMPICILINA	CEFTRIAXONA
% de colonias resistentes a los antibióticos	86.4%	56.3%

Se observó un mayor porcentaje de resistencia bacteriana a la ampicilina y un menor porcentaje de resistencia bacteriana a la ceftriaxona, como ya se había determinado en las muestras iniciales.

Cabe señalar que estos resultados son de gran interés, ya que se observa que más de la mitad de la población de colonias bacterianas que tenemos en la piel es multirresistente a los antibióticos. Estas bacterias pueden vivir sin ocasionar ningún daño en varias superficies de la piel; sin embargo cuando la piel se lástima o sufre una punción, las bacterias podrían ingresar en la herida y provocar una infección en varias partes del cuerpo como por ejemplo en pulmones, huesos, articulaciones, el corazón, la sangre y el sistema nervioso central.

6.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Gram positivos

Se obtuvo que la especie *Staphylococcus coagulasa positivo* fue la que se presentó en un 72.2%, seguida de *Staphylococcus sp.* con un 9.3 % y *Streptococcus sp.* se presentó en un 4.2%.

Gram negativos

La especie *Pseudomonas aeruginosa* se presentó en un 9.4 %, seguida de *Escherichia coli* con un 3.8% y *Enterobacter aerogenes* con un 1.1%.

6.7 PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO

Tabla 3. Concentración de bromuro de etidio a la cual sobrevivieron las cepas multirresistentes a los antibióticos.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE BROMURO DE ETIDIO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A3	300
B1	250
C5	500
D4	250
E2	450

Se utilizó como control negativo a *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (cepa utilizada en control de calidad) y como era de esperarse no registró crecimiento al exponerlo a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio.

De las 5 cepas seleccionadas, 3 de ellas se encontraron por debajo de la concentración de 400 mg/mL y 2 de ellas se encontraron por encima de esta, las cuales pertenecen a la zona C: palma de la mano cerca del meñique y a la zona E: conducto auricular externo.

Estos resultados hacen pensar que el mecanismo de bombas de expulsión se está llevando a cabo de manera muy importante, ya que se esperaba que las bacterias no sobrevivieran por encima de una concentración de 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio al ser la concentración mínima inhibitoria de este compuesto.

7. CONCLUSIONES

La resistencia a los antibióticos es una causa importante de la prolongación de la estancia hospitalaria, al fracasar la terapia inicial antimicrobiana.

Para el manejo adecuado y racional de los antibióticos se requiere de una serie de conocimientos:

- 1) la farmacología y farmacocinética de los diversos antibióticos;
- 2) las indicaciones de primer orden y las alternativas en las diversas enfermedades infecciosas; y
- 3) los efectos adversos y las contraindicaciones.

El conocimiento de los mecanismos de resistencia permitirá una terapia antimicrobiana racional y dirigida, además de ayudar al diseño de nuevos fármacos. La resistencia no sólo es intrínseca, sino también adaptativa, situación que hay que tomar en cuenta para establecer regímenes adecuados de tratamiento.

Si bien el manejo de los antibióticos sigue siendo un arte, no debe ser considerado como una simple receta de cocina, el médico y el personal de salud deberán estar en constante actualización, a fin de evitar problemas de resistencia, reacciones adversas a los medicamentos, lo que permitirá un mejor manejo de las diversas patologías que afectan al ser humano.

La lucha clásica y única conocida contra la multirresistencia bacteriana hasta ahora, ha consistido en buscar nuevos y más potentes antibióticos, en una carrera de velocidad paralela entre la aparición de nuevas formas resistentes de bacterias y la comercialización de nuevos antibióticos.

El fenómeno de la resistencia a los antibióticos es una amenaza global, que afecta a todos los ámbitos (medicina, veterinaria, seguridad alimentaria y medio ambiente) y es una preocupación de carácter mundial y por ello se requiere la adopción de medidas armonizadas y globalizadas para su control.

Las bacterias disponen de un gran arsenal de estrategias para defenderse del efecto de los antibióticos, que han sido modeladas a lo largo de millones de años de evolución y nosotros, con nuestra escasa experiencia, debemos utilizar otras estrategias para poder tener una buena posición en esta “batalla” desigual y conseguir controlar el problema de la resistencia a los antibióticos que tanta repercusión clínica posee. El conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia es útil, en primer lugar para desarrollar nuevos fármacos que evadan los mecanismos de resistencia presentes y en segundo lugar para poder elegir nuevas combinaciones antibióticas, más eficaces para el tratamiento de las infecciones producidas por las bacterias.

En este proyecto:

- Se determinó la existencia de bacterias multirresistentes a antibióticos en piel sana de 10 adolescentes asintomáticos de 13 y 15 años de edad, que no habían recibido terapia con antibióticos en los últimos seis meses previos al estudio.
- Se seleccionaron 5 zonas del cuerpo humano que caracterizan diversas condiciones de la piel.
- Mediante un método no invasivo se aislaron bacterias provenientes de las 5 zonas del cuerpo seleccionadas.

- Se logró identificar a las especies bacterianas presentes en la piel de los adolescentes, las cuales presentan resistencia a los antibióticos. Curiosamente se encontraron las mismas especies bacterianas (a excepción de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*) respecto a un estudio realizado en este mismo laboratorio hace un año en piel sana de niños en edad preescolar, esto puede deberse a dos principales factores, el primero de ellos podría ser los hábitos de higiene y el segundo el papel que juegan las hormonas, ya que se sabe que algunos microorganismos son hormona-dependiente. (Veiga, 2010)

Finalmente, en este trabajo se logró determinar que los adolescentes asintomáticos presentan bacterias multirresistentes a los antibióticos en su piel sana, lo que causa un potencial problema de salud pública, ya que se observa que la resistencia bacteriana ha ido incrementando y que si no se controla ésta, los individuos en edades posteriores tendrán que recurrir a dosis cercanas a la tóxica para poder controlar las infecciones y enfermedades bacterianas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez, F. **Decálogo de normas para la utilización de antibióticos en pacientes críticos.** Med intensiva, 24: 69-77, 2000.
2. Becerra, G. **Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias.** Enf Inf Microbiol, 29 (2): 70-76, 2009.
3. Betriu, C. **Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci.** Chemother, 38: 2183-2186, 2004.
4. Castillo, F. **Recomendaciones para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.** 42: 321-327, 2006.
5. Cordies, L., Machado, L., y Hamilton, M. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.** Acta médica. 8 (1): 13-27, 1998.
6. Embid, A. **Resistencia de las bacterias a los antibióticos.** Revista de medicinas complementarias, N° 53, 2005.
7. García, J. **Mecanismo de acción de los antibióticos.** Ed. Doyma S.A., 203: 1-17, 2001.
8. Garza, U. **Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana.** Salud Pública Mex, 51 suppl 3:S439-S446, 2009.
9. Gobernado, M. **Reflexiones sobre resistencia bacteriana.** Rev Esp Quimioterap, 307: 281-294, 2003.
10. Hart, D. **Evaluation of antibiotic usage: A comprehensive look at alternative approaches.** Rev Infect Dis; 3:745-753, 2001.
11. Hemalatha, V. **Detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients.** Indian J Med Res, 122: 148-152, 2005.
12. Hidayat, L. **Highdose vancomycin therapy for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection.** Arch Intern Med, 166:2138-44, 2006.

13. Hoffman, L. **Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation.** Nature, 436: 1171-1175, 2005.
14. Jasovich, A. **El control de los antibióticos ¿Hasta dónde duela?.** Rev Chil Infect, 20 (Supl 1): S63 - S69, 2003.
15. Kassirer, J. **Doctor discontent.** N Engl J Med, 339 (21):1543-4, 1998.
16. Kenneth, T. **The bacterial normal flora.** Universidad de Wisconsin, 2007.
17. Kosmidis, J. **Emergence of resistant bacterial strains during treatment of infections in the respiratory tract.** Scan J Infect Dis, 49 (supp): 135-139, 2003.
18. Law C, Maloney P, Wang D. **Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters.** Annu Rev Microbiol. 62: 289-305, 2008.
19. Mainous, A. **Controlling antibiotic resistance: Will we someday see limited prescribing autonomy?.** Amer Fam Phys, 63(6), 2001.
20. Manguña, C. **Uso adecuado y racional de los antibióticos.** Acta Med Per, 2006.
21. Martínez, J. **Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en Gram positivos.** Monográfico, 4: 803-813, 2006.
22. McDermott, W. **Microbial persistence.** Yale J Biol Med, 30: 257-291, 1998.
23. Mella, D. **The need for new antibiotics.** Clin. Microbiol. Infect. 10: 1-9, 2009.
24. Millanao, T. **Antibacterial therapy. Principles of selection and use of antibacterial agent.** Infectious Disease clinic of North America. 14(2), 2011.
25. Mosby, W. **Interacción con los microorganismos.** Departamento de Bacteriología de Madison, 2005.
26. Muñoz, J. **Mecanismo de resistencia a quinolonas.** Rev Esp Quimioterapia, 10: 348-349, 1997.

27. Paterson, D. **Restrictive antibiotic policies are appropriate in intensive care units.** Crit Care Med, 31 (1), 2003.
28. Pérez, L. **Mecanismos de adquisición de Resistencia a los antibióticos.** Hospital Universitario Marqués, 1998.
29. Ponchner, D. **Microbios: habitantes de la piel.** Epicentro de la ciencia, 2009.
30. Ribas, A. **Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes a 21 antibióticos.** Medigraphic, 2006.
31. Sánchez, F. **Mecanismo de acción de los antibióticos.** Agencia de salud pública Barcelona, 2007.
32. Segre, J.A. **Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders.** J. Clin. Invest. 116: 1150–1158, 2006.
33. Silver, L. **Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics?.** Biochem Pharmacol, 71:996- 1005, 2006.
34. 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.
35. Tenson, T. **Antibiotics and the ribosome.** Mol Microbiol, 59:1664-77, 2006.
36. Torres, C. **La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming.** Academia de farmacia, 2012.
37. Van Bambeke, F. **Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives.** Curr Opi Pharmacol, 4:471-8, 2004.
38. Vázquez, H. **La piel del adolescente.** XXI Congreso Nacional de Medicina de la adolescencia, 2012.
39. Veiga, R. **Características de la piel.** Congreso de dermatología, 2010.
40. Walsh, T. **Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?.** Clin Microbiol Rev, 18: 306-325, 2005.