

300627

13

26

UNIVERSIDAD LA SALLE



ESCUELA DE QUIMICA

Incorporada a la U. N. A. M.

" ADAPTACION DEL METODO DE KIRBY - BAUER PARA SU UTILIZACION CON BRUCELLA SPP "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO - FARMACEUTICO - BIOLOGO

P R E S E N T A N :
EMMA CATALINA MARTINEZ GALINDO
CRISTINA PEREZ DELGADO



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

[Handwritten signature]

Jul 20/90.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA INCORPORADA A LA UNAM

"ADAPTACION DEL METODO DE KIRBY-BAUER PARA SU UTILIZACION
CON BRUCELLA SPP"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOTICO BIOLOGO
PRESENTAN

ENYA CAVALINA MARTINEZ GALINDO
CRISTINA MOREI BELGADO

DIRECTOR DE TESIS: Q.B.F. GUARALUPE BORALES REZA

[Handwritten signature]

MEXICO, D.F.

1990

I N D I C E

	Página
RESUMEN	1
OBJETIVO GENERAL	5
CAPITULO I. INTRODUCCION	6
1.1.1 GENERALIDADES	6
1.1.2 METABOLISMO	7
1.1.3 CARACTERISTICAS DE CULTIVO	9
1.1.4 CARACTERISTICAS DE LA MEMBRANA CELULAR	9
1.2.1 BRUCELOSIS	10
1.2.2 ETIOLOGIA	11
1.2.3 EPIDEMIOLOGIA	13
1.2.4 MEDIDAS PROFILACTICAS EN LA BRUCELOSIS HUMANA.	15
1.3.1 ANTIBIOTICOS. DEFINICION	16
1.3.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS.	18

1.3.3	GENERALIDADES DE LOS ANTIBIÓ- TICOS MÁS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA BRUCELOSIS.	19
1.3.3.1	TETRACICLINAS, AUREOMICINA Y TETRACICLINA.	19
1.3.3.1.1	ESTRUCTURA QUÍMICA	20
1.3.3.1.2	EPECTO COMO ANTIBIÓMICIANO	21
1.3.3.1.3	MECANISMOS DE ACCIÓN	21
1.3.3.1.4	RESISTENCIA	22
1.3.3.1.5	EPECTOS INDESEABLES	22
1.3.3.1.6	USOS TERAPÉUTICOS	23
1.3.3.2	AMINOGLUCOSIDOS. KANAMICINA AMIKACINA, ESTREPTOMICINA Y GENTAMICINA	23
1.3.3.2.1	ESTRUCTURA QUÍMICA	23
1.3.3.2.2	MECANISMO DE ACCIÓN	26
1.3.3.2.3	RESISTENCIA MICROBIANA	26
1.3.3.2.4	EPECTOS INDESEABLES	29
1.3.3.3	RIFAMPICINA	31
1.3.3.3.1	ESTRUCTURA QUÍMICA	31
1.3.3.3.2	ACTIVIDAD ANTIBIÓMICIANA	32
1.3.3.3.3	RESISTENCIA BACTERIANA	32
1.3.3.3.4	MECANISMO DE ACCIÓN	33
1.3.3.3.5	EPECTOS INDESEABLES	33
1.3.3.4	TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL	34
1.3.3.4.1	ESTRUCTURA QUÍMICA	34
1.3.3.4.2	ESPECTRO ANTIBACTERIANO	35
1.3.3.4.3	MECANISMO DE ACCIÓN	36

1.3.3.4.4	RESISTENCIA DACTILOM	36
1.3.3.4.5	EFECTOS INHIBIDORES	37
1.4	DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS DACTERIAS	37

CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS I

	MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS	
	EN ESTUDIO	41
	PRESERVACION DE LAS CEPAS POR SECADO RAPIDO EN CONGELACION	
2.1	SEMBRADO EN PLACA	41
2.2	SELECCION DE COLONIAS.	42
2.2.1	OBSERVACION DIRECTA	42
2.2.2	PRUEBA CON ACRIPLAVINA	43
2.2.3	TENCION DE GRAN GERMINACION DE HACIEND	44
2.2.4	MORFOLOGIA MICROSCOPICA POR EL METODO DE ZIEHL-NEELSON GERMINACION DE STAMPI	45
2.3	SEMBRADO EN TUBO	46
2.4	SEMBRADO EN FRASCO BIRILLA	47
2.5	SEMBRADO EN BOTELLA ROJO	47
2.6	COSECHA	48

CATÁLOGO 3. MATERIAL Y MÉTODOS II

	ADAPTACION DEL METODO DE K-B	
	PARA SU USO CON <u>BRUCELLA SPP.</u>	88
3.1	METODO TRADICIONAL DE K-B	89
3.1.1	MATERIAL Y MEDIOS	89
3.1.2	DESCRIPCION DEL METODO TRADICIONAL DE K-B	91
3.1.3	RESULTADOS DE LA APLICACION DEL METODO TRADICIONAL DE K-B CON <u>BRUCELLA SPP.</u>	93
3.2	DETERMINACION DEL MEDIO DE CULTIVO OPTIMO PARA EL CRECIMIENTO DE <u>BRUCELLA SPP.</u>	93
3.2.1	SELECCION DEL MEDIO LIGADO	93
3.2.1.1	MATERIAL	93
3.2.1.2	DESARROLLO	93
3.2.1.3	RESULTADOS	94
3.2.2	SELECCION DEL MEDIO SOLIDO	94
3.2.2.1	MATERIAL	95
3.2.2.2	DESARROLLO	95
3.2.2.3	RESULTADOS	94
3.3	DETERMINACION DE LA EDAD DE LA CEPA	97
3.3.1	MATERIAL	97
3.3.2	DESARROLLO	97
3.3.3	RESULTADOS	97
3.4	SELECCION DEL TIEMPO DE APLICACION DE LOS DISCOS	99

3.4.1	MATERIAL	59
3.4.2	DESARROLLO	59
3.4.3	RESULTADOS	60
3.5	CUENTA BACTERIANA	63
3.5.1	MATERIAL	63
3.5.2	DESARROLLO	63
3.5.3	RESULTADOS	63
3.6	DISCUSION DE LA MODIFICACION DE LAS VARIABLES CRITICAS AL METODO TRADICIONAL DE K-B PARA SU UTILIZACION CON <u>S. sap.</u>	65
3.6.1	MEDIO DE CULTIVO	65
3.6.2	EDAD DE LA CEPY	66
3.6.3	C. DE PREINCUBACION	67
3.6.4	T. DE INCUBACION	67
3.6.5	CANTIDAD DEL INOCULO	67
3.6.6	SELECCION DE LOS ANTIBIOTICOS	68

CAPITULO 4. MATERIAL Y METODOS III

	ENSAYO DEL METODO DE K-B PARA SU USO ESPECIFICO CON CEPMs AISLADAS DE <u>S. sap.</u>	67
4.1	MATERIAL	69
4.2	DESCRIPCION DEL METODO DE K-B PARA USO ESPECIFICO CON <u>S. sap.</u>	70
4.3	RESULTADOS	71

CAPITULO 5. INTERPRETACION DE RESULTADOS	73
CAPITULO 6. DISCUSION Y CONCLUSIONES	77
APENDICE A. PREPARACION DE MEDIOS Y REACTIVOS	83
BIBLIOGRAFIA	

INDICE DE CONADOS Y FIGURAS.

	Pagina
FIGURA 1. CICLO DE INFECCION DE VARIAS ESPECIES DE <u>BACILLUS SPP.</u>	13
FIGURA 2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA TETRACICLINA	20
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA KANAMICINA	24
FIGURA 4. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA AMINOCICINA	25
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA ESTREPTOMICINA	26
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA GENTAMICINA	27
FIGURA 7. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RIFAMPICINA	31
FIGURA 8. ESTRUCTURA QUIMICA DEL TROMETOPRIM	34
FIGURA 9. ESTRUCTURA QUIMICA DEL SULFOMETOXASOL	35
FIGURA 10. COMPARACION ENTRE EL METODO TRADICIONAL DE K-S Y SU VARIACION PARA <u>D₅₀</u>	
TABLA 1. PRUEBAS DIDQUIMICAS	8

TABLA 3.1 CRECIMIENTO RELATIVO EN MEDIO LÍQUIDO	54
TABLA 3.2 CRECIMIENTO RELATIVO EN PLACA	55
TABLA 3.3 CRECIMIENTO POR VARIACION DEL TIEMPO DE PREINCUBACION	58
TABLA 3.4 DIAMETROS DE INHIBICION EN DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION	61
TABLA 3.5 CUENTA BACTERIANA PROMEDIO	64
TABLA 4 DIAMETROS OBTENIDOS CON LA MODIFICACION ESPECIFICA PARA EL GENERO <u>BRUCELLA</u> DEL METODO DE K-O	71
TABLA 5.1 RANGO DE CLASIFICACION PARA LOS DISTINTOS ANTIOTIICOS	76
TABLA 5.2 PORCENTAJE DE CEPAS EN LAS DIFERENTES CATEGORIAS	75

RESUMEN:

La brucelosis o fiebre de Malta es una enfermedad de animales domésticos y silvestres que puede ser transmitida al hombre por el contacto con animales infectados o productos de estos, a través de vías como la ingestión, el contacto directo o la inhalación.

En México se han aislado cuatro especies de Brucella:

B. melitensis, B. abortus, B. canis y B. canis. Todos los animales son susceptibles a todas las especies en mayor o menor grado.

El cuadro clínico de la brucelosis se presenta después de un tiempo variable de incubación, desde 2 a 3 semanas hasta 3 o 4 meses.

Los síntomas típicos de la enfermedad son: Fatiga, escalofríos, dolor de cabeza y sudoraciones nocturnas, los cuales se prolongan hasta por tres meses antes de que la enfermedad se vuelva grave y debilitante y requiera de atención médica.

La enfermedad puede presentarse en otras dos formas: la subclínica en la cual los síntomas son inconsistentes o muy leves y pueden curarse en forma insapiente, llegando a resolverse sin ningún tratamiento; y la brucelosis crónica en la cual las manifestaciones clínicas se prolongan por un tiempo mínimo de cuatro meses. esta última forma, la brucelosis crónica, puede ser el resultado de una brucelosis aguda tratada en forma inadecuada.

En México, la brucelosis se ha manifestado como una enfermedad endémica en áreas como la Comarca Lagunera, el Bajío, las zonas

ganaderas de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila. Además se han detectado focos importantes en entidades como Tlaxcala, Puebla, Veracruz y Chiapas. Durante el periodo de 1974-1983 el INHS reportó una tasa promedio de 18 casos de brucelosis humana por cada 100 000 habitantes.

Para el tratamiento de la brucelosis se recomiendan varios antimicrobianos y es muy importante seleccionar el más adecuado, pues de esto depende la eficacia del mismo, evita la aparición de efectos colaterales (irritación, molestias epigástricas, diarrea, acidosis, ototoxicidad, nefrotoxicidad, bloqueo muscular, reacciones alérgicas etc.) y el desarrollo de cepas resistentes.

Para la selección de un antibiótico adecuado para el tratamiento de diferentes patógenos se emplea el método de Kirby-Bauer que nos permite conocer la susceptibilidad de un microorganismo frente a diferentes antimicrobianos, este método está estandarizado para ser usado con microorganismos de crecimiento rápido, tales como enterobacterias y estafilococos.

En este trabajo se buscaron y optimizaron las condiciones de cultivo y manejo para emplear este método en pruebas de sensibilidad para Brucella spp., que como ya se conoce es un M.O. de difícil crecimiento en condiciones normales.

Una vez determinadas las condiciones óptimas, se ensayó la modificación del método para su uso específico con Brucella spp. modificando al método convencional la variables que se muestran en la tabla N.

TABLA II
COMPARACION ENTRE EL METODO TRADICIONAL DE KIRBY BAUER Y SU MODIFICACION
ESPECIFICA PARA *Staphylococcus*

	METODO TRADICIONAL	MODIFICACION PARA <i>S. aureus</i>
INOCULACION EN CALDO	INOCULAR EN CALDO CASEINA DE SOYA INCUBAR 2 HRS A 37°C	SEMIENAR EN TUBO DE AGAR INCLINADO INCUBAR 30 HRS A 37°C AGREGAR CALDO BRUCELA INCUBAR 2 HRS A 37°C
AJUSTE DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA	UTILIZAR EL TUBO 0.2 DEL HOPELOMETRO	UTILIZAR EL TUBO 0.5 DEL HOPELOMETRO
SEMIENADO EN PLACA	UTILIZAR PAPER MULLER HINTON	UTILIZAR AGAR NOBLE Y MEDIO ISOSENSITIZ
COLOCACION DE LOS DISCOS	CINCO DISCOS POR CAJA DE 100100 MM INCUBAR 18 HRS A 37°C MEDIR HALOS DE INIBICION	CINCO DISCOS POR CAJA DE 100100 MM INCUBAR 18 HRS A 37°C MEDIR HALOS DE INIBICION

El método propuesto se probó con 104 copas de Bruceia aisladas, tipificadas y proporcionadas por el Laboratorio de Brucelosis del INET (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) con los siguientes discos de antibióticos comerciales de concentración estándar:

Clorotetraciclina	30 mcg
Gentamicina	150 mcg
Deletetraciclina	30 mcg
Kanamicina	30 mcg
Estreptomina	10 mcg
Rifampicina	5 mcg
Amikacina	30 mcg
Tetraciclina	30 mcg
Trimoprim-Sulfametoxazol	25 mcg

Las conclusiones de este trabajo son:

- El método de Kirby-Bauer es adaptable para Bruceia spp.
- Las variables modificadas favorecieron el crecimiento de Bruceia spp.
- Se deben utilizar caldo bruceia y medio Isosensitest de Oxoid como medio de cultivo para este ensayo.
- No se observó el crecimiento de colonias resistentes en ninguna de las zonas de inhibición.
- Este ensayo de resultados cualitativos que pueden servir de apoyo al médico en la selección del antibiótico para tratar la brucelosis.

- Es aconsejable evitar el uso indiscriminado de fármacos ya que esto implica peligros como:
 - Bacteriización diseminada de la población, aparición de erupciones, fiebre, trastornos sanguíneos y enfermedades del tejido conjuntivo.
 - Cambios en la flora intestinal
 - Enmascaramiento de infecciones graves
 - Resistencia medicamentosa en poblaciones microbianas

OBJETIVO GENERAL.

El objetivo de este trabajo es la adaptación del método de Kirby-Bauer para la determinación de sensibilidad a antimicrobianos según los requerimientos y condiciones específicas de crecimiento del género Brucella, para que dicha prueba se pueda establecer como de rutina dentro del diagnóstico clínico y sirva de apoyo al médico para la selección correcta del tratamiento farmacológico específico para cada caso de brucelosis, evitando así complicaciones y el uso desmedido de agentes antimicrobianos lo cual actualmente representa un problema de salud pública a nivel mundial.

CAPITULO I

INTRODUCCION.

1.1.1 GENERALIDADES

La brucelosis o fiebre de Malta es una típica zoonosis en la que el hombre es un huésped accidental por contacto con animales infectados o mediante el consumo de alimentos de origen animal, esto, a través de vías como la ingestión, inhalación o contacto directo.

En México se han aislado 4 de las 6 especies de Brucella existentes:

Brucella melitensis cuyos huéspedes principales son cabras y borregos, esta especie es la más patógena para el hombre; Brucella abortus es menos patógena y ataca principalmente bovinos.

Brucella suis, comparable a Brucella melitensis en cuanto a su virulencia ataca a los cerdos, y Brucella canis que se presenta en perros.

Las principales instituciones sanitarias del mundo reconocen que por sus características microbiológicas, epidemiológicas y patológicas, la brucelosis es una enfermedad compleja, difícil de controlar y erradicar, tanto en la población animal como humana.

La brucelosis animal en México constituye uno de los problemas que más afectan a la ganadería nacional causando grandes pérdidas

ocasionales por concepto de leche no producida, sacrificio prematuro de animales y por aborto de crías.

El agente etiológico de esta enfermedad es la Brucella spp la cual es un bacilo corto de 0.5 a 0.7 micras, generalmente se presenta sólo o en pares; no presenta cápsula, flagelos ni esporas.

En crecimiento, se puede observar que están rodeadas por una vaina. No son móviles, son Gram negativos y ácido resistentes (en tinción modificada por Stapp de Ziehl-Neelsen) (35,45).

La primera descripción del género Brucella fue hecha por Meyer y Shea en 1920. Desde entonces, se han revisado periódicamente las pruebas de clasificación del género.

Dentro del género Brucella las principales especies son: Brucella abortus, Brucella canis, Brucella melitensis, Brucella suis y Brucella neotomae. (35)

1.1.2 METABOLISMO.

La Brucella spp es quimioautótrofica, el metabolismo oxidativo es su principal fuente de energía y los organismos son aeróbicos en su mayoría. Sus requerimientos indispensables son de tiamina, nicotinamida y biotina.

El catabolismo de la glucosa ocurre por la vía de fermentación anaeróbica en combinación con el ciclo del ácido tricarboxílico. Cataboliza i-eritrol a través de una serie de intermediarios como

dihidroxicacato de fosfato y CO₂. Esta última secuencia metabólica es característica universal del género Brucella.

El crecimiento de la brucela se estimula con la adición de antioácidos y con pentotenato de calcio e i-eritrol para algunas cepas.

Para su desarrollo algunas cepas requieren de CO₂ (principalmente Brucella abortus). El rango de temperatura en que tienen crecimiento es de 20° a 40°C, pero la óptima es de 37°C. El pH óptimo se encuentra entre 6.6 y 7.4.

La brucela presenta una actividad limitada en las pruebas bioquímicas convencionales, su comportamiento se resume en la siguiente tabla (19,30,35,53):

TABLA 1.

"PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BRUCELLA SPEC."

Catalasa	(+)
Coagulase	(+) (excepto <u>Brucella melitensis</u> y <u>Brucella abortus</u>).
Ureasa	(variable)
Producción de H ₂ S	(variable)
Reducción de NO ₃	(+) (excepto <u>Brucella abortus</u>).
HR	(-)
γP	(-)
Indol	(-)
Citrato	(-)

1.1.3 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO:

Casi todas las cepas de *Brucella* crecen muy poco en medios peptonados, y no presentan crecimiento si el inoculo es pequeño, los medios adecuados son compuestos de triptosa o soya tripticosa. El crecimiento puede estimularse adicionando de 1 a 5% (v/v) de suero equino o bovino.

Las colonias en estos medios son pequeñas, redondas, convexas, lisas, translúcidas y brillantes, pudiéndose volver parducas con el tiempo. (34)

El crecimiento en medio líquido produce turbidez y un ligero sedimento, no formando película. No se encuentra crecimiento en medios que contienen sales biliares, selenito o telurito.

1.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA CELULAR.

La membrana celular de *Brucella* spp tiene la misma ultraestructura de una bacteria Gram negativa: membrana externa, péptido glucano, espacio periplásmico y membrana citoplasmática.

La *Brucella* se presenta en dos fases distintas, según su especie y las características de cultivo: fase rugosa (r) y fase lisa (s). La membrana exterior de la *Brucella* en forma lisa (s) contiene varios tipos de polisacáridos, entre los cuales el lipopolisacárido (l) en su forma tóxica es el más importante, ya que además de ser una endotoxina, es el responsable de las reacciones de hipersensibilidad inmediata en reacciones serológicas contra el antígeno estándar. Este lipopolisacárido presenta los sitios antigénicos A+B.

La fracción de peptidoglucano tiene una estructura mas compleja que la de Escherichia coli, ya que consiste en una capa externa que contiene aminas y polisacáridos, esta fracción tiene actividad como antígeno. Existe finalmente, una fracción proteica, de origen citoplasmático que es extraída de Brucella spp por una solución salina, llamada brucelina, la cual ocasiona hipersensibilidad cuando se inyecta en forma intradérmica. (18)

1.2.1 Brucelosis.

La brucela, al entrar al organismo, es transportada por polimeros nucleares, alojándose primeramente en los ganglios linfáticos, donde en lugar de ser destruida, se mantiene por tiempo indefinido, destruyendo en muchos casos la célula huésped al reproducirse, produciéndose la bacteremia. Posteriormente, las brucelas se van alojando en diferentes órganos del huésped de manera intracelular. (19)

La forma de infección de la brucela es el factor que determina la dificultad del tratamiento de la brucelosis.

La brucela se localiza y reproduce dentro de las células del huésped, protegiéndose de los mecanismos humorales. Se ha propuesto la capacidad de la bacteria para crecer a nivel intracelular como posible mecanismo de virulencia. La localización intracelular de Brucella spp es de fundamental importancia en su relación con el huésped, ya que al penetrar a la célula no solo se destruye ésta, sino que la bacteria es protegida de los factores humorales, y la célula huésped (que inicialmente son los macrófagos) constituirá un medio para alcanzar otras partes del organismo. (20)

1.2.2 SIN TOMATOLOGIA.

Dado que la brucelosis es una enfermedad de tipo multiforme, no es posible secuenciar sus manifestaciones clínicas, sin embargo, a continuación se presentan los síntomas y signos más usuales de la enfermedad:

SINTOMAS

- fiebre.
- sudoración.
- síntomas musculares y osteoarticulares.
- leucopenia con linfocitosis.
- astenia.
- anorexia (34)

PSIQUOSIS

- Hepatomegalia, ictericia, síndrome hemorrágico, ascitis brucelar. Formas hepáticas combinadas con nefritis, neumonitis y cirrosis brucelar esto, debido a que, el hígado participa regularmente en el proceso patológico de la brucelosis.
- Splenomegalia.- Se presenta síndrome de inhibición medular (anemia, leucopenia y trombocitopenia).
- Adenopatías.- Se presenta enfermedad de las glándulas, particularmente en los ganglios linfáticos.

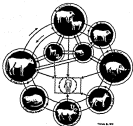
= Neurobrucelosis.- El polimorfismo de la brucelosis se manifiesta también en sus complicaciones neurológicas, apareciendo cuadros clínicos muy variados y diversos en los distintos sujetos. Para valorar la participación del Sistema Nervioso en el transcurso de la enfermedad, se puede decir que existen una serie de manifestaciones inespecíficas, tales como cuadros reactivos por la cronicidad de la infección, manifestaciones totalmente superponibles a las que aparecen en el transcurso de una infección aguda de cualquier etiología y que no se consideran verdaderas neurobrucelosis. Se habla de neurobrucelosis cuando existe un conjunto de complicaciones neurológicas precoces o tardías, debido a la localización del germen en el Sistema Nervioso y , por lo tanto, clínicamente se encuentran manifestaciones neurológicas claramente objetivas por exploración, junto con una serie de alteraciones del líquido cefalorraquídeo de mayor o menor importancia. El mecanismo de la neurobrucelosis no se conoce con certeza, existen teorías que intentan explicarlo, como un mecanismo inme-alérgico, e bien una invasión por continuidad a partir de focos óseos de la columna. (32)

= Miocarditis brucelar.-Es una presentación poco frecuente de la brucelosis, no obstante, se presentan ocasionalmente localizaciones viscerales con manifestaciones clínicas poco frecuentes de tipo respiratorio, renales y cardíacas, éstas últimas localizadas en el miocardio, originando la miocarditis brucelar, en la cual se tiene una invasión de dicho órgano por el propio germen o las toxinas liberadas , este fenómeno puede traer consigo complicaciones como infartos trabeculares. (33)

1.2.3 EPIDEMIOLOGIA

La bruceosis está considerada como una zoonosis muy ampliamente extendida en el mundo, que entre otras cosas causa grandes pérdidas económicas.

La ocurrencia de la infección aguda e incapacitante causada por Brucella melitensis al hombre, generalmente coincide con la infección de cabras y ovejas. (1)



"Ciclo de infección de varias especies de Brucella spp." (50)

Se han identificado claramente los principales focos de infección, los cuales se encuentran en la cuenca del Mediterráneo, Asia Central y Latinoamérica (1,27). En México, los datos con que se cuenta no resultan ser fieles sino hasta el año de 1977 fecha en la cual comienzan programas de control de la enfermedad.

Para medir y evaluar el impacto de la brucelosis en la salud pública se utilizan indicadores para cuantificar los daños que ocasiona a la salud y las pérdidas económicas que genera.

La mortalidad a nivel nacional es poca frecuente, debido en gran parte, a las características y evolución de la enfermedad, por lo que es sumamente difícil que el médico que certifica la defunción identifique a ésta como la causa básica, sobreviniendo la muerte por efectos colaterales y por múltiples complicaciones. Conscientes de estas limitaciones y, de acuerdo a la información disponible, en el periodo de 1970 a 1982 se presentaron 1300 defunciones, esto implica un promedio de 0.31 defunciones por cada 100,000 habitantes.

De acuerdo a la distribución geográfica, entre 1971 y 1980, la mortalidad por brucelosis fue mayor en los estados de Colima, Coahuila, Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango.

En cuanto al número de casos y morbilidad por brucelosis en México, en 1987 se reportaron 5,492 con una tasa de 7.8 casos por cada 100,00 habitantes. En México, son excepcionales las áreas donde no se ha observado brucelosis. A pesar de los grandes contrastes que

se presentan en la frecuencia y distribución, del año de 1965 a 1986, las entidades que han ocupado los primeros lugares son los estados de Querétaro, Coahuila, Guanajuato, Nuevo León, Zacatecas, Michoacán, San Luis Potosí y Chihuahua. Hay que notar que algunos Estados como Sonora, Sinaloa, Tamaulipas y Puebla, en la serie histórica ocuparon lugares intermedios o finales y, en los últimos cinco años, ocupen los primeros lugares.

En la mayor parte de los Estados donde es mas frecuente la Brucelosis humana existe relación con la mayor población y producción de leche bovina y caprina, excepto Jalisco, México, Veracruz, Chiapas e Hidalgo, que a pesar de tener una producción lechera bovina considerable, reporta pocos casos de Brucelosis humana.

En relación a la morbilidad por grupos de edad en el quinquenio 1980-1984, el primer lugar lo ocupó el grupo de 45 a 64 años con una tasa promedio de 5 casos por cada 100,000 habitantes; El segundo lugar fue para el grupo de 15 a 44 años con una tasa promedio de 4.7 casos por cada 100,000 habitantes siguiéndolo por orden de frecuencia los de 5-14 años; 45 y mas ; 1-4 y, finalmente, menores de un año. (10,15)

En relación al sexo, el 61.18 % corresponde al sexo masculino, a expensas de los grupos antes mencionados.

Al estudiar el factor ocupacional, se observa que el 28.24% corresponde a las seas de casa y el 32.69% a los estudiantes, en labores que impliquen el contacto con animales se encontró que 5.98% son pastores y 1.17% veterinarios. (44)

1.2.4 MEDIDAS PROFILACTICAS EN LA BRUCELOSIS HUMANA.

Durante los primeros años que siguieron al descubrimiento del agente causal de la brucelosis humana, afectado por Bruce hace aproximadamente 100 años, recurrió a numerosos "remedios" cuya efectividad no fue comprobada porque era muy difícil de evaluar.

Fue hasta 1903 que el primer tratamiento biológico fué propuesto por Wright, utilizó sueros hiperinmunes preparados en diversas animales y, en algunos casos, obtenidos de donadores humanos que se habían recuperado de la enfermedad.

La vacuna-terapia vino a reforzar esta práctica empírica, la cual consistió en series de inyecciones de suspensiones gruesas de bruceas muertas o, en algunos casos, vivas por vía endovenosa.

Las vacunas de células fueron posteriormente desplazadas o ampliadas por tratamientos con extractos, lisados o filtrados de bruceas de una o varias especies. En México, Ruiz Castañeda, en 1937, fue el primero en utilizar extractos de tres especies de brucela seguidos de Carrillo y otros investigadores. En la actualidad se sigue empleando la vacuna-terapia con células enteras y extractos. (27,20,41)

Otra medida profiláctica utilizada es la desinfección de objetos expuestos a un individuo o animal enfermo, secreciones uterinas, orina o fetos muertos de animales enfermos, con el fin de eliminar el germen y evitar epidemias. (34)

Entre los primeros agentes antimicrobianos que se aplicaron al tratamiento de la brucelosis humana se tienen las sulfonamidas y la

estreptomicina, seleccionadas en base a su actividad bacteriostática o bactericida en pruebas "in vitro".

La aureomicina (clorotetraciclina) y la terramicina fueron introducidas posteriormente en la terapia de la brucelosis con base en observaciones clínicas empíricas.

Las bacterias del género Brucella generalmente son sensibles "in vitro" a una amplia gama de antibióticos:

Tetraciclinas, aminoglucósidos, estreptomicina, cloranfenicol, rifampicina sulfonamidas y trimetoprim-sulfametoxazol. (27)

El esquema terapéutico más empleado a nivel mundial se describe a continuación:

+ primera elección.- Una tetraciclina + estreptomicina o rifampicina.

+ segunda elección.- Cloranfenicol + estreptomicina.

+ tercera elección.- Trimetoprim-sulfametoxazol.

(5, 10, 17, 21, 23, 25, 29, 39, 40, 44, 49)

Solo se recomienda el uso de cefalosporinas en el caso de meningocelulitis brucelar. (37)

1.3.1 ANTIBIÓTICOS; DEFINICIÓN:

Los antibióticos son sustancias producidas por una serie de microorganismos (hongos, actinomicetos y bacterias) que tienen la capacidad de inhibir selectivamente el crecimiento de otros

microorganismos, pudiendo en algunos casos llegar a destruirlos por completo.

Estas sustancias presentan entre sí diferencias en lo que se refiere a su estructura química, propiedades farmacológicas y espectro antimicrobiano.

Se considera que un antibiótico es ideal cuando presenta las siguientes características:

-La sustancia debe tener actividad bactericida para un amplio espectro de microorganismos, y al mismo tiempo, prevenir el desarrollo de cepas resistentes.

-La sustancia debe ser efectivamente distribuida a todos los tejidos y líquidos corporales además, debe permanecer en estos por períodos prolongados.

-La acción de los antibióticos no debe causar daños al huésped ni debe causar alteraciones en los mecanismos de defensa del mismo.

(43)

1.3.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS.

Los antibióticos ejercen su acción por medio de un complejo mecanismo que se describe a continuación:

I.- Fijación del antibiótico ya sea a la pared celular o a la membrana celular .El antibiótico se fijará en sitios receptores específicos en los cuales puede ocurrir una o varias de las siguientes fenómenos:

- a.- Inhibición de la síntesis de la pared celular o bien la alteración de su estructura.
- b.- Interferencia en las funciones o en la síntesis de la membrana celular.
- c.- Inhibición de ciertas reacciones químicas a nivel intracelular necesarias para llevar a cabo alguna vía metabólica.

II.- Cuando estas acciones no resultan ser bactericidas, pueden aparecer organismos resistentes, ya sea por adaptación o bien, por una mutación .Los mutantes, pueden aparecer después del cambio de un solo gen en una determinada población de microorganismos, los cuales desarrollan una pequeña pero uniforme resistencia, la cual será más acentuada en cada nueva generación. El factor de resistencia, posiblemente un plásmido, puede ser transmitido de un organismo resistente a uno susceptible por medio de un mecanismo de conjugación; Esta información puede implicar el desarrollo de resistencia a uno o mas fármacos. La

conjugación se puede llevar a cabo entre organismos de diferente especie, en especial en el caso de las bacterias Gram negativas. (43)

iii.- La resistencia se puede manifestar de las siguientes formas:

- a.- Destrucción del fármaco por una enzima inducida, la cual puede llegar a ser una enzima constitutiva. (47)
- b.- Impedimento de la fijación o penetración del fármaco a la célula bacteriana.
- c.- Inhibición metabólica.
- d.- Reducción de susceptibilidad a la fagocitosis. (43)

1.3.3. GENERALIDADES DE LOS ANTIBIÓTICOS MÁS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA BRUCELOSIS.

1.3.3.1 TETRACICLINAS; AUREOMICINA Y TERRAMICINA.

Las tetraciclinas son sintetizadas por Streptomyces aureofaciens (clortetraciclina o aureomicina) y por el Streptomyces tetraceus (oxitetraciclina o terramicina) (48).

1.2.3.1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Las tetraciclinas son derivados de la naltazeno carbocanida polícíclica.

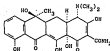


FIGURA 2

"ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA TETRACICLINA"

Las bases cristalinas son compuestos liposolubles amarillos, inodoros y poco amargos. Son compuestos poco solubles en agua a pH=7 (0.25-0.5 mg/ml) forman sales de Na y clorhidratos solubles, en ambos casos pierden actividad con relativa rapidez cuando están en solución. (33)

1.3.3.1.2 EFECTO COMO ANTIMICROBIANOS.

Poseen amplia actividad en bacterias G(+) y G(-) (especial actividad contra hongos "in vitro". Son consideradas como drogas bacteriostáticas, sólo afectan a aquellos microorganismos que se multiplican. (44)

Las tetraciclinas se combinan fuertemente con iones metálicos, lo cual puede interferir con la actividad y absorción de la molécula. (32)

Debido a que la absorción será incompleta, se tendrá acumulación del fármaco en el tracto intestinal, lo cual afectará notablemente a la flora intestinal. (44)

1.3.3.1.3 MECANISMOS DE ACCIÓN.

El sitio de acción de las tetraciclinas es el ribosoma bacteriano el mecanismo requiere de los siguientes pasos:

- Difusión pasiva a través de los poros hidrófilos de la membrana bacteriana externa.
- Transporte activo a través de la membrana citoplasmática externa. Este fenómeno requiere de un portador protéico periplasmático.

Una vez que las tetraciclinas ganan acceso a la célula bacteriana, inhiben la síntesis de proteínas y se ligan específicamente a los ribosomas 30S; Parecen impedir el acceso de aminoil RNA al sitio aceptor del complejo RNA-ribosoma, esto evitará la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. (48)

1.3.3.1.4 RESISTENCIA.

Las poblaciones microbianas susceptibles, contienen un pequeño número de mutantes resistentes a las tetraciclinas, el grado de resistencia es pequeño, usualmente sólo de 2 a 6 veces mayor que en la población progenitora.

La resistencia a las tetraciclinas puede ser transmitida de una bacteria (B-) a otra por medio de plásmidos (elementos genéticos extracromosómicos que se alojan en las bacterias).

La aparición de bacterias resistentes a las tetraciclinas es consecuencia de la selección ejercida sobre las poblaciones microbianas por el extenso uso de dichos fármacos. (32)

1.3.3.1.5 EFECTOS INDESEABLES.

- En algunas personas, puede haber molestias epigástricas y abdominales, náuseas, vómito y diarrea. (46)
- Daños hepático-bactericia, ictericia, etc. (47)
- Urea en enfermos renales. (8)
- Deposición del fármaco en dientes y huesos.

1.3.3.1.4 USOS TERAPÉUTICOS.

El tratamiento produce excelentes resultados para B.cellulosa, B.alis y B.abortus. Las formas agudas y crónicas responden eficazmente. (4,21,25,46,49)

1.3.3.2 ANINGLUCOSIDOS:

KANAMICINA, AMIKACINA, ESTREPTOMICINA, GENTAMICINA.

Los aminoglucósidos son fármacos que contienen aminoazúcares en unión glucosídica. Son poliacetones y su polaridad es, en parte, responsable de las propiedades farmacológicas comunes a todos los miembros de este grupo.

Se utilizan generalmente para tratar infecciones de bacterias G(-) actúan interfiriendo en la síntesis proteica de los microorganismos susceptibles. (46)

1.3.3.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA.

Los aminoglucósidos están constituidos por dos o más aminoazúcares unidos por un enlace glucosídico a un núcleo de hexosa central.

KANAMICINA.- En esta familia se incluyen las kanamicinas A y B, en su estructura, dos aminoazúcares se unen a una 2-deoxiestreptamina los preparados comerciales de kanamicina contiene los tipos A y B.

(46)

Es sintetizada por el Streptomyces kanamyceticus. Su fórmula condensada es: C₂₀ H₃₄ O₁₁.

La kanamicina A se presenta como prismas irregulares, solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos. D₅₀=550µg/kg (en ratón).

La kanamicina B forma cristales solubles en agua y formaldehído, es parcialmente soluble en cloroformo e isopropanol y es insoluble en otros solventes orgánicos. Su D₅₀ es 136 µg/kg. (en ratón) "



FIGURA 3

"ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA KANAMICINA".(33)

AMIRACINA.-Es un derivado semisintético de la kanamicina; Se prepara a partir de la kanamicina^A, su fórmula condensada es C22 H43 N5 O13 es un polvo blanco cristalino soluble en agua e insoluble en alcohol; Su DL50= 560mg/kg (en ratón).

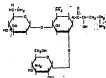


FIGURA 4.

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA AMIRACINA. (33)

ESTROPTOMICINA.-La estreptomicina y la dihidroestreptomicina difieren de los demás aminoglicosidos porque contienen estreptina en lugar de 2-desoxiestreptamina y porque el aminocitol no esta en la posición central. (46)

Su fórmula molecular es $C_{21}H_{40}N_7O_{12}$, es sintetizado por el Actinomiceto Streptomyces griseus por fermentación aeróbica, generalmente se encuentra formando sales de calcio o cloro fosfatos.

Es un polvo, inodoro, higroscópico, soluble en agua e insoluble en alcohol, cloroformo y éter.

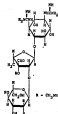


FIGURA 8

"ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ESTROPTOMICINA".(33)

SENTAMICINA.- Es un antibiótico de amplio espectro derivado del actinomiceto Micromonospora purpurea y es el aminoglicosido más utilizado para el tratamiento de bacterias G(-). La variable más utilizada es la Sentamicina C (1) cuya fórmula condensada es C21 H33 N5 O8. El 67 es un polvo blanco y amorfo, soluble en agua y piridina. Tiene una DL50 = 430 mg por kg. (En ratón)

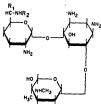


Figura. 6

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA SENTAMICINA

1.3.3.2 MECANISMO DE ACCION.

Los antibióticos aminoglucósidos son de rápida acción bactericida, esto, debido a su acción a nivel de ribosomas en donde inhiben la síntesis proteica y disminuyen la fidelidad de la traducción del RNA.

Estos antibióticos se difunden fácilmente a través de canales acuosos formados por proteínas "porinas" en la membrana externa de las bacterias G(-) y por lo tanto, ingresan en el espacio periplásmico. El transporte de aminoglucósidos a través de la membrana citoplasmática interna, depende del transporte electrónico que requiere de un potencial de membrana para la penetración de estos antibióticos, este transporte puede ser bloqueado por iones divalentes, hiperosmolaridad, reducción del pH y anaerobiosis.

Después del transporte a través de la membrana citoplasmática los aminoglucósidos se unen a los polisomas o inhiben la síntesis de proteínas, función que requiere de energía. El principal sitio intracelular de acción de los aminoglucósidos es la subunidad ribosomal 30S que consiste en 21 proteínas y una sola molécula 16S de RNA. (44)

1.3.3.3 RESISTENCIA MICROBIANA.

Se ha observado resistencia a la Estreptomicina tanto "in vivo" como "in vitro", esta se presenta cuando una mutación cromosómica altera o elimina el sitio de unión para el medicamento sobre la subunidad ribosomal 30S, por lo tanto, existe lectura errónea del RNA.

Los organismos resistentes a la estreptomicina inactivan el medicamento por medio de acilación o fosforilación. Otros, presentan resistencia por ser impermeables a dicho fármaco.

Las grandes poblaciones microbianas de todos los microorganismos susceptibles contienen mutantes resistentes. Un mutante puede ser de 2 a 1000 veces más resistente que la población progenitora. (34)

En poblaciones bacterianas, susceptibles a la kanamicina, se presentan raras mutantes resistentes. La mayor parte de éstas, solo son de 2 a 4 veces más resistentes que la población pero, en presencia del medicamento, la selección gradual lleva a la aparición de mutantes altamente resistentes. (35)

La resistencia puede deberse a la adquisición de un plásmido asociado con la elaboración de enzimas que metabolizan éstos fármacos, las bacterias que adquieren resistencia a un aminoglucósido pueden presentar resistencia a los demás. (36).

1.3.3.2.5 EFECTOS INSEGURAS.

Todos los aminoglucósidos tienen potencial para producir:

-OTOXICIDAD.-Se sugiere que los aminoglucósidos interfieren en el sistema de transporte activo esencial para el mantenimiento de balance de la endolinfa, esto a su vez altera las concentraciones correctas de los iones en los líquidos laberínticos con deterioro de la actividad eléctrica y la conducción nerviosa. (38)

-NEFROTÓXICAS.-Esta toxicidad se debe a la acumulación y retención del aminoglucósido en la corteza renal por las células tubulares proximales.(18)

-BLOQUEO MUSCULAR.- Se puede presentar Bloqueo muscular como reacción tóxica aguda, esto se debe a la inhibición de la liberación parasimpática del Acetil CoA, y la reducción de la sensibilidad postsináptica al transmisor.(18)

-REACCIONES ALÉRGICAS.-Se puede llegar a presentar eosinofilia, fiebre, dermatitis, otomastitis y shock anafiláctico.(45)

1.3.3.3 RIFAMPICINA.

Las rifamicinas son un grupo de antibióticos complejos de estructura química similar y que son sintetizados por el *Streptomyces mediterraneus*. (45)

1.3.3.3.1 ESTRUCTURA QUIMICA.

La rifamicina es un ion bipolar, soluble en solventes orgánicos y en agua a pH ácido, su fórmula molecular es: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, forma cristales rojo-naranjas solubles en cloroformo, acetato de etilo y metanol; Es parcialmente soluble en agua.

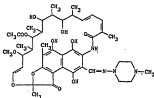


FIGURA 7

"ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RIFAMPICINA", (33)

1.3.3.2 ACTIVIDAD ANTIBIOTICA.

La rifampicina inhibe el crecimiento de casi todas las bacterias G(+), y algunas G(-). (46)

La rifampicina es un antibiótico de amplio espectro que ha demostrado ser un potente agente antibrucelar en pruebas "in vitro", la rifampicina es absorbida rápidamente y alcanza altas concentraciones en el plasma distribuyéndose, de esta forma, por todo el cuerpo. Este antibiótico penetra al interior de las células, llegando hasta el retículo endotelial en donde se encuentra la brucela. (29)

Es común utilizar la rifampicina en combinación con alguna tetraciclina en el tratamiento de la brucelosis aún cuando pruebas "in vitro" han demostrado que la asociación de dichos antibióticos tienen los mismos efectos que la rifampicina en concentraciones mayores de 4 microgramos/ml, dosis con la cual se destruyen al 99.9% de Brucella spp.

La combinación de dichas drogas tiene como fin el lograr un efecto sinérgico, y evitar la aparición de cepas resistentes. (17,36)

1.3.3.3 RESISTENCIA BACTERIANA.

Los microorganismos pueden desarrollar rápida resistencia a la rifampicina; esta resistencia se debe a una alteración del efecto de esta droga- la RNA-polimerasa- dependiente de GMP. Algunas mutantes bacterianas resistentes a la rifampicina tendrán menor virulencia.

(46)

1.3.3.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN.

La rifampicina inhibe la RNA-polimerasa dependiente del DNA del microorganismo, llevando a la supresión de la iniciación de la formación de cadenas en la síntesis del RNA. El sitio específico de acción de esta enzima es la subunidad "beta" de la RNA-polimerasa.

La rifampicina puede llegar a inhibir la síntesis de DNA en las mitocondrias de los mamíferos pero, para dicho efecto, se requieren de concentraciones mucho mayores a aquellas utilizadas para la inhibición enzimática bacteriana. (33,46)

La rifampicina penetra bien en las células fagocíticas y puede actuar a los microorganismos intracelulares. Los mutantes resistentes a este antibiótico pueden presentar una RNA polimerasa alterada. (33-4)

1.3.3.3.5 EFECTOS INDESEABLES.

La rifampicina tiene potencial de producir:

- Ictericia en enfermos hepáticos o alcohólicos.
- Trastornos gastrointestinales (náuseas, vómito, diarrea).
- Trastornos al SNC (fatiga, caídas, mareos, confusión).
- Reacciones de hipersensibilidad (urticaria, eosinofilia, hemólisis, y hemoglobinuria). (44,46)

1.3.3.4 TRIMETOPRIM-SULFAMETOXISOL (TMP-SMZ).

La combinación de estos antimicrobianos constituye una aplicación práctica de la siguiente consideración teórica:

"Si dos drogas actúan sobre pasos sucesivos de la vía de una reacción enzimática obligada en las bacterias, el resultado de su combinación es sinérgico". (46)

1.3.3.4.1 ESTRUCTURA QUÍMICA.

El trimetoprim es un polvo cristalino blanco o blanco-crema soluble en alcohol bencílico, propileno glicol y cloroformo; parcialmente soluble en agua y etanol.

El trimetoprim tiene un BLSO= 7000 mg/kg (en ratón).



FIGURA 9

"ESTRUCTURA QUÍMICA DEL TRIMETOPRIM" (TMP). (33)

El sulfametoxazol tiene como fórmula molecular $C_{10}H_{11}NO_3S$ se encuentra formando cristales anegros solubles en agua y etanol con un DL50=3442mg/kg.

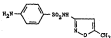


FIGURA 7

"ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SULFAMETOXAZOL" (SH21-133)

1.3.3.4.2 ESPECTRO ANTIBACTERIANO.

El espectro antibacteriano del trimetoprim es similar al del sulfametoxazol aunque la potencia del primero es de 20 a 100 veces más potente que la segunda. La mayoría de los microorganismos G⁺ y G⁻ son susceptibles al trimetoprim, pero puede desarrollarse resistencia cuando el fármaco se utiliza solo. (16)

1.3.3.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN.

Es el resultado de su acción sobre dos pasos enzimáticos para la síntesis del tetrahidrofolato (FH4) el cual participa en reacciones de biosíntesis vitales para el crecimiento y supervivencia celular.

En los microorganismos, el dihidrofolato (FH2) es sintetizado "de novo" a partir del ácido p-aminobenzoico (PABA), reacción que es bloqueada por el sulfametoxazol. En cambio en los mamíferos, el ácido fólico (FA), dihidrofolato (FH2) y el tetrahidrofolato (FH4) son proporcionados por la dieta. En todas las especies el tetrahidrofolato (FH4) es transformado a dihidrofolato (FH2) en la síntesis del timidilato, en esta reacción, es necesaria la dihidrofolato reductasa.

El trimetoprim inhibe selectivamente a todas las reducciones microbianas y la efectividad de esta inhibición se acentúa por el bloqueo de la síntesis del dihidrofolato (FH2). (23)

Otras consecuencias fisiológicas causadas por el bloqueo de la síntesis del tetrahidrofolato (FH4) en las bacterias son: inhibición de síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos. (10,14)

1.3.3.4.4 RESISTENCIA BACTERIANA.

Generalmente la combinación Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ) resulta ser un agente antibacteriano de amplio espectro, solamente se ha observado resistencia en algunos microorganismos como Escherichia coli que presenta resistencia al trimetoprim (TMP) pero esta disminuye considerablemente en presencia de sulfametoxazol SMZ. (10)

En algunos casos se observa que existe cierta interferencia a la acción del Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ) y se ha comprobado que el factor responsable de dicho fenómeno es la presencia de clindamida.

1.3.3.4.5 EFECTOS INDESEABLES

No se ha visto que el TMP-SMZ induzca deficiencia de folato en personas normales, sin embargo, en pacientes deficientes de folato puede causar megaloblastosis, leucopenia o trombocitopenia .

El empleo de este fármaco en pacientes con enfermedad renal puede ser seguido de una disfunción renal persistente. (44)

1.4 DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS BACTERIAS.

Las contraindicaciones mencionadas por el uso de antibióticos, así como el incremento de la resistencia bacteriana a dichos fármacos con el consecuente fracaso en la terapia de numerosas infecciones, hacen necesaria la implementación de técnicas de detección de susceptibilidad hacia los antibióticos como prueba de rutina recomendada en el diagnóstico clínico. Los resultados obtenidos en dichas pruebas ayudarán al médico a seleccionar el agente antimicrobiano más apropiado para el tratamiento clínico de la infección. (2)

En la actualidad, los principales métodos que se utilizan para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a un antibiótico,

comprenden tanto las pruebas de difusión, como los métodos de difusión en caldo diluido o microdifusión en tubo y en placa de agar, y la prueba de difusión del disco en agar utilizando discos impregnados con antibióticos.

Se han propuesto varios métodos de difusión, como el de Eriksen o ICS y el de Kirby-Bauer (K-B); este último es el más recomendado para determinar la susceptibilidad a antibióticos por la Organización Mundial de la Salud, la FDA y la NCCLS, pues presenta ventajas por ser rápido, económico, de técnica sencilla y fácilmente reproducible. (2,51,55)

Las condiciones del método de Kirby-Bauer (K-B) están estandarizadas para bacterias que crecen fácilmente en agar Mueller-Hinton, sin necesidad de una suplementación en un tiempo que va de 18 a 24 hrs, como por ejemplo, E. coli y Staphylococcus.

En lo que se refiere a las bacterias fastidiosas (incluyendo en este grupo a todas aquellas bacterias de difícil crecimiento en condiciones normales), así como en el caso de bacterias de crecimiento lento (tiempo de crecimiento promedio mayor a 24 hrs) es necesario cambiar algunas variables como son: la composición del medio, atmósfera utilizada, temperatura y tiempo de incubación entre otras. En estos casos indicar las variaciones hechas al método, ya que dichas modificaciones pueden afectar los resultados. (52)

Los métodos de difusión nos dan resultados cualitativos de fácil interpretación, ya que de acuerdo con la zona clara de inhibición de

crecimiento alrededor del disco de antibiótico, los microorganismos se clasifican en:

-SUSCEPTIBLE.

Un microorganismo es susceptible cuando es inhibido por una concentración de antibiótico menor a la que se encuentra en el plasma de un paciente tratado con la dosis del fármaco prescrita normalmente para el tratamiento específico del tipo de infección en cuestión.

-INTERMEDIO.

La susceptibilidad de un microorganismo se considera intermedia cuando la infección cede a dosis del fármaco mayores a las que normalmente se prescriben o bien, cuando el microorganismo se encuentra en un órgano o fluido corporal donde se concentra el fármaco, como orina y bilis.

Esta categoría actúa como una "zona amortiguadora" que compensa errores técnicos durante el procedimiento. Evita la clasificación errónea de un determinado microorganismo en alguna de las otras dos categorías. Un resultado intermedio justifica la repetición de la prueba.

-RESISTENTE.

Se puede considerar que una cepa es resistente cuando tolera concentraciones de un antibiótico mayores a las que generalmente inhiben el crecimiento de otras cepas de la misma especie.
(2,4,5,33,52)

La zona clara alrededor del disco se debe a dos fenómenos:

Primero, el disco absorbe agua del agar y por tanto el antibiótico comienza a disolverse; esta solución comienza a difundirse a través del agar, teniendo un gradiente de concentración del fármaco utilizado que va de altas concentraciones en el borde del disco hasta concentraciones muy bajas, que son incapaces de inhibir el crecimiento microbiano.

El segundo fenómeno consiste en que el microorganismo comienza a llevar a cabo su metabolismo y después de su fase Lag ó de adaptación comenzará su crecimiento, el cual tiene un comportamiento logarítmico.

(4)

El tamaño de la zona clara o zona de inhibición está determinado por la concentración del antibiótico que se encuentra en la misma y la susceptibilidad del microorganismo aislado en estudio. Por tanto, dentro de las limitaciones de la prueba, el diámetro de la zona de inhibición representa la susceptibilidad relativa a un antibiótico determinado. (3)

Para la interpretación de cualquiera de las pruebas de susceptibilidad "in vitro", conviene recordar que son, esencialmente, "medidas artificiales". Los datos obtenidos en ellas sólo dan una idea aproximada de la acción inhibitoria contra los microorganismos. El único criterio absoluto de la eficacia de un antibiótico es la respuesta clínica del paciente cuando se le administra la dosis adecuada de la droga correcta, ya que ninguna prueba "in vitro" considera propiedades farmacocinéticas de los antibióticos, respecto del sistema inmune del huésped y difusión del fármaco a través de los diferentes tejidos corporales. (2,6)

CAPITULO II

"MATERIAL Y METODOS I"

"MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO".

2. PRESERVACION DE LAS CEPAS POR SECADO RAPIDO EN CONGELACION (LIOFILIZACION). Las cepas trabajadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS "DR. RAFAEL MARTINEZ BAEZ" (INBET) de la Dirección General de Epidemiología, en donde fueron aisladas, identificadas y tipificadas.

Las cepas se recibieron sembradas en tubo con agar inclinado, por lo que fue necesario resembrar para poder liofilizar y mantener de esta manera la viabilidad de las cepas.

2.1 SEMBRADO EN PLACA

"Material y medios"

- Ovas bacteriológicas tratadas con alcohol al 70% durante 20 minutos y posteriormente flameadas.
- Cajas con agar brucela adicionadas con el 10% de suero (equino o bovino).

Desarrollo

- Se toma el inóculo con el asa y se cubre aproximadamente una cuarta parte de la placa con estrías próximas y paralelas, en seguida, poner el asa en alcohol al 70%.
- Tomando otra asa efectuar un ligero pase por la parte inferior de la región ya estriada, girar la placa en ángulo recto y estriar aproximadamente la mitad de la parte restante sin superponer las estrías.
- Girar la placa 180 grados y estriar el resto de la misma, evitando cubrir las zonas ya estriadas.
- Incubar a 37°C durante 48 horas. (Por no ser un aislamiento "primo" no se requiere de atmósfera de CO₂).

2.2 SELECCIÓN DE COLONIAS.

Se eligen colonias lisas (por medio de la prueba de serotipinas) que presenten las morfologías, colonial y microscópica propias de la *Brucella* por observación directa y tinciones de Gram y Ziehl-Neelsen modificada.

2.2.1 OBSERVACIÓN DIRECTA.

Después de 48 horas de incubación, las colonias que aparecen en la superficie del medio se deben observar con un diámetro de 2-3mm, translúcidas, circulares, sin pigmento, convexas y lisas con brillo en la superficie. (45)

3.3.2 PRUEBA CON ACRIFLAVINA: (DRAHL Y BOGGESTEL 1947)

Reactivos

- Acriflavina diluida 1:1000 con agua destilada neutra.
- Solución salina fenolada.

Desarrollo

-Se deposita en la parte inferior de un portabjeto limpio y desengrasado una gota de la solución de acriflavina y en la parte superior del mismo se pone una gota de solución salina fenolada en la cual se suspende una porción muy pequeña del cultivo. Se mezclan las gotas homogenizando perfectamente con el asa, observar los resultados frente a una lámpara.

Interpretación

Los resultados se interpretan como sigue:

- Las colonias lisas permanecen en suspensión.
- Las colonias rugosas aglutinan inmediatamente. (27)

2.2.3 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA POR TINCIÓN DE GRAM (MODIFICACIÓN DE HUCKER). (2)

Reactivos y materiales

- Hechizo de la solución de cristal violeta con solución de oxalato.
- Solución de yodo de Gram.
- Decolorante.
- Contracolorante (safranina madre)
- Portaobjetos.
- Placa con agua destilada.

Desarrolla

- Preparar frotis, dejar secar y fijar a la placa.
- Bañar el portaobjetos con colorante de cristal violeta, que se deja durante 10 segundos.
- Lavar con agua destilada.
- Bañar con solución de yodo y dejar el mordiente durante 10 seg.
- Enjuagar bien con agua destilada.
- Decolorar con solución de alcohol-acetona hasta que el solvente aparezca incoloro. Esto requiere de 10 a 20 segundos.
- Contracolorar con safranina durante 10 segundos, lavar con agua.

- Dejar secar.
- Leer al microscopio.

Interpretación

- Se deben de observar bacilas Gram(-) de 0.5 X 0.5 hasta 2.0 micras de longitud.

2.2.4 HEMOCULTIVA MICROSCOPICA POR EL METODO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO POR STAMP (1951).

Reactivos

- Fucsina fenicada de la coloracion de Ziehl-Neelsen diluida 1:10 con agua destilada, y filtrada.
- Acido acetico al 0.5% v/v.
- Verde de Malaquita
- Asas microbiológicas
- Portabjetos

Procedimientos

- Secar y fijar frotis a la flama
- Cubrir la preparacion con fucsina diluida, dejar la solucion durante 20 minutos.
- Lavar con agua
- Decolorar con ácido acetico al 0.5% por 30 segundos
- Lavar con agua

- Cubrir el frotil con verde de malaquita dejando esta solución durante 30 minutos.
- Lavar con agua, dejar secar y observar.

#Interpretación#

Las brucelas aparecerán como cocobacilos de color rojo, ya que son ácido resistentes débiles, otros organismos que no tengan esta característica tomarán la coloración verde.

2.3 SEMBRADO EN TUBO

Una vez elegidas las colonias S (-) y ácido resistentes, se siembran en tubo inclinado con agar brucela por el método de estría.

#Material#

- Asas bacteriológicas previamente esterilizadas en alcohol al 70% y flameadas,
- Tubos con agar brucela.

#Desarrollo#

- Se toma el inculo con el asa bacteriológica y se siembra en el tubo con estrías próximas y paralelas evitando superponer las estrías, sembrar a 37° C durante 48 hrs. Al terminar el sembrado el asa se sumerge en la solución de alcohol al 70%.

3.4 SEMBRADO EN FRASCO BEHLLA

Sembrar en fríasas semillas con el fin de obtener un gran volúmen de masa celular.

Material

- Frascos semillas con agar H.
- Asas bacteriológicas previamente sumergidas en alcohol al 70% y flameadas.

Desarrollo

- Tomar con el asa una cantidad de inóculo suficiente, sembrar en el frasco por medio de estrías paralelas y próximas. Incubar a 37°C durante 48 hrs.

3.5 SEMBRADO EN BOTELLA ROUX

Pasar la masa celular obtenida en el paso anterior a botella Roux.

Material

- Jeringas de 20 ml estériles
- Botellas Roux con agar H
- Caldo brucela.

Desarrollar

- La masa celular obtenida en el frasco se extrae y se recoge con una cantidad suficiente de caldo brucella, agitando suavemente el frasco hasta observar que el caldo se vuelve turbio, en seguida extraer el caldo inoculado con jeringa y sembrarlo en la botella Roux. El caldo debe distribuirse lo más uniformemente posible en toda la superficie del medio.
- Incubar a 37°C durante 48 hrs.

3.6 COSECHA

Material

- Pipetas de 10 ml estériles con algodón en la boquilla
- Bombilla para pipeta
- Ampollitas estériles y etiquetadas con el número de copa.
- Solución estabilizadora liofilizante (Bectocastone).

Desarrollar

- La masa celular obtenida en la botella se cosecha agregando 7 ml de bectocastone y moviendo suavemente la botella hasta obtener una suspensión, ésta se transfiere con una pipeta a las ampollitas 10.5 ml por ampollita.
(Ya que existe el riesgo de la formación de aerosoles nunca se debe pipetear con la boca).

- Una vez llenas las ampollitas, se cubre con un tapón de algodón y se congela a -40°C durante 24 hrs pasado este tiempo, se sacan del congelador e inmediatamente se colocan en un frasco de cristal el cual se conecta a un condensador que está unido a una bomba de alto vacío hasta observar que los cultivos quedan completamente desecados.
- Terminada la liofilización el frasco con las ampollitas se colocan en un desecador y finalmente, se sellan las ampollitas a la flama en una campana de flujo laminar.

Todas las operaciones que se realizan durante el proceso de liofilización requieren de extremadas medidas de seguridad como la utilización de tapabocas, lentes y guantes así como el manejo del material contaminado en la campana de flujo laminar y esterilización del mismo para evitar que el personal del laboratorio sea contagiado accidentalmente de brucelosis.

CAPITULO III

"MATERIAL Y METODOS I"

"ADAPTACION DEL METODO DE KIRBY-BAUER

PARA SU USO CON Brucella spp."

3.1 METODO TRADICIONAL DE KIRBY-BAUER

3.1.1 MATERIAL Y MEDIOS.

- Cepas de referencia.

- Brucella abortus H19

- Brucella suis 1330

- Brucella abortus 540

- Discos de antibióticos (Los discos deben guardarse en refrigeración (2-8°C), se recomienda que 1 o 2 horas antes de su utilización se saquen del refrigerador con el fin de que su temperatura se equilibre con la del laboratorio.

- Cajas con agar Mueller-Hinton

- Extensor turbidimétrico/ tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Parland

- Hisopos estériles

- Agitador Vortex

- Tubos con tapón de rosca con caldo de caseína de soya

- Solución salina al 0.5% estéril

- Asas microbiológicas tratadas con alcohol durante 30 minutos y flameadas.
- Pinzas estériles.

3.1.2 DESCRIPCION DEL METODO TRADICIONAL DE KIRBY-BAUER.(2,7,34)

- Se toman de 3 a 10 colonias que presenten la morfología colonial característica y con ellas se inocula el tubo con caldo de caseína de soja, esto se incuba de 2 a 4 horas.
- Pasado este tiempo se cuantifica la turbidez obtenida con el estándar tubo 0.3 del nefelómetro de Mc Farland y se ajusta con solución salina. Para obtener mejores resultados, los tubos deben ser agitados con vortex y la lectura se hace contra un fondo blanco con líneas de distintos colores.
- Una vez ajustado el inóculo, se siembra en la caja de agar Mueller-Hinton con ayuda de un hisopo. La aplicación se hace pasando el hisopo tres veces por toda la superficie del medio, girando la caja 40 grados entre cada aplicación y una pasada final por todo el borde de la caja. Este inóculo se deja secar por unos minutos a temperatura ambiente.
- Se colocan los discos de antibiótico con pinzas estériles (Número 7 para cajas de 100 X 10 mm) . La distribución de los discos debe ser lo más uniforme posible y procurar que queden alejados por lo menos 15 mm del borde de la caja.

- Las cajas son incubadas a 35° C. Si es posible se recomienda no encerrar más de dos cajas y no utilizar atmósfera de CO₂.
- Después de 16 a 18 horas de incubación, se examinan las cajas y se miden los diámetros de inhibición con regla y se registran expresados en milímetros. Esta operación se hace junto a una fuente de luz que incida en la caja con un ángulo deforzado de 45 grados.
- En caso que en la zona de inhibición se observe un crecimiento de algunas colonias, estas se extraen, se resembran y finalmente se someten a pruebas de identificación para detectar si se trata de una cepa resistente o bien de alguna contaminación.

3.1.3 RESULTADOS DE LA APLICACION DEL METODO TRADICIONAL DE KIRBY-BAUER CON Brucella spp.

Se ensayó el método tradicional de Kirby-Bauer descrito en la sección anterior con las cepas de referencia H19,1330 y B40 aplicando discos comerciales de concentración estándar de bacitracina de 10 U.I. (a la que Brucella spp es resistente), penicilina de 10 U.I (con la que Brucella spp presenta una resistencia total) y con tetraciclina de 30 microgramos (a la que Brucella spp es sensible). Cada una de las cepas de referencia se probó por triplicado con cada antibiótico y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Los diámetros de inhibición de la penicilina y tetraciclina se

traslaparon por completo haciendo imposible la lectura.

- Alrededor de disco de tetraciclina no se observó inhibición.

Puesto que bajo estas condiciones experimentales, la lectura de los diámetros de inhibición para la penicilina y la tetraciclina resultó imposible debido a un traslape total de los halos, se prosigió a modificar las condiciones de dicho método con el fin de favorecer el crecimiento de Brucella_spp.

A continuación se describen los distintos ensayos realizados con el fin de lograr la adaptación del método de Kirby-Bauer para su uso específico con Brucella_spp.

3.2 DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA EL CRECIMIENTO DE Brucella_spp.

3.2.1 Selección del medio líquido.

3.2.1.1 Material

- Tubos con caldo brucella.
- Tubos con caldo de caseína de soya.
- Tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland.
- Cepas de referencia, H19, 1330 y 540.

3.2.1.2 Sembrado

- Se sembró cada una de las cepas de referencia en ambos medios.

ajustando el índice con el tubo 0.5 del nefelómetro con el fin de partir con una densidad bacteriana semejante, se incubaron a 37°C durante 48 hrs.

3.2.1.3 Resultados

- Los tubos se compararon con los distintos tubos del nefelómetro contra un fondo blanco. (Este ensayo se realizó por triplicado)

Tabla 3.1 "CRECIMIENTO RELATIVO EN MEDIO LIQUIDO".

Crecimiento aproximado			
medio de cultivo	Nuº	1330	840
Caseta de soya.	2	2	2
Caldo brucela.	4	4	3

Los números se refieren al tubo del nefelómetro con el que presentaron mayor semejanza.

3.2.2 Selección del medio de cultivo sólido.

3.2.2.1 Material

- Cajas de agar Mueller Hinton (M-H) Bioxon.
- Cajas de agar Mueller Hinton (M-H) Difco.
- Cajas de con medio Isosensitest de Oxoid.
- Tubo 0.3 del nefelómetro de Mc Farland.
- Copas de referencia R17,1330 y 340.
- Asas bacteriológicas pasadas por alcohol y flameadas.
- Hisopos estériles.

3.2.2.2 Desarrollo

- Se tomó inóculo y se sembró en caldo brucella, ajustando la densidad de bacteria con el tubo 0.3 del nefelómetro.
- El caldo ajustado se sembró en las placas con los diferentes medios.
- Se incubó a 37°C durante 48 hrs y se observó el crecimiento.

3.2.2.3 Resultados

- Este ensayo se corrió por triplicado y se observó el crecimiento relativo en cada placa.

TABLA 3.2 = CRECIMIENTO RELATIVO EN PLACA*

crecimiento relativo			
medio de cultivo	M19	1200	940
ISOSENSITEST	XXX	XXX	XXX
H-H BIODON	±	±	±
H-H BIFCO	XXX	XXX	XXX

± = CRECIMIENTO ESCASO

XX = CRECIMIENTO MEDIO

XXX = CRECIMIENTO ABUNDANTE

3.3 DETERMINACION DE LA EDAD DE LA CEPN.

3.3.1 Material

- Cepas de referencia. N19,1330 y 540.
- Tubos de agar H.
- Caldo brucela.
- Jeringas de 1 ml
- Nefelómetro.

3.3.2 Desarrollo

- Se sembró cada una de las cepas de referencia en 3 tubos con estrias próximas y paralelas y se incubaron durante 24, 30 y 48 horas a 37°C.
- Pasado el tiempo de incubación se agregó a cada tubo 1 ml de caldo brucela y se compararon las densidades de bacteria obtenidas con los diferentes tubos del nefelómetro.

3.3.3 Resultados

- Este ensayo se corrió por triplicado,obteniéndose siempre las lecturas que se muestran en la tabla 3.3

“TABLA 3.3-CRECIMIENTO POR VARIACION DEL TIEMPO DE INCUBACION.”

crecimiento			
tiempo de incubacion	H19	1330	864
24 hrs	1	1	1
30 hrs	3	4	3
48 hrs	8	8	8

Los numeros se refieren al tubo del nefelómetro con el que presentaron mayor semejanza.

3.4 DETERMINACION DEL TIEMPO DE APLICACION DE LOS DISCOS.

3.4.1 Material

- Discos de tetraciclina de 30 microgramos
- Cepa 1330 (Discolla sp.)
- Nefelómetro
- Hisopos
- Agitador Vortex
- Caldo Brucela
- Tubos con agar H.
- Cajas con medio ISOSENSITEST de Oxoid ,
- Asas bacteriológicas
- Placas estériles.

3.4.2 Desarrollo

Se siguió el método de K-B (ver capítulo III sección 3.1) efectuando los siguientes cambios:

- Se utilizó un cultivo de 50 hrs en vez de uno de más de 40 hrs.
- Se utilizó caldo brucela en vez de caseína de soya.
- Se sembró en cajas con medio isosensitest en vez de Mueller-Hinton.

Una vez sembrado el inóculo ajustado en la placa, ésta se incubó a 37° C durante los siguientes periodos de tiempo:

- 5 minutos
- 15 minutos
- 30 minutos
- 1 hora
- 1.5 horas
- 4 horas
- 7 horas

Transcurridos los diferentes tiempos se colocaron los discos y se volvió a incubar cada placa a 37°C durante un tiempo de 18 hrs.

3.4.3 Resultados.

Este ensayo se corrió por triplicado para cada uno de los diferentes tiempos de preincubación. Las lecturas promedio se muestran en la tabla 3.4

TABLA 3.4 "DIÁMETROS DE INHIBICIÓN PROMEDIOS EN DIFERENTES TIEMPOS DE COLOCACION DEL DISCO O DE PREINCUBACION"

tiempo de preincubación	* Diámetro promedio para tetraciclina 130 microgramos con la cepa 1330*
5 min.	43 mm
15 min.	45 mm
30 min	41 mm
1 hr	40 mm
1,5 hrs	38 mm
4 hrs	30 mm

TABLA 3.4

"DIAMETROS DE INHIBICION PROMEDIO EN DIFERENTES
TIEMPOS DE COLOCACION DEL DISCO O DE PREINCUBACION"

tiempo de preincubacion	" Diámetro promedio para tetraciclinas 10 microgramos con la cepa 1336"
7 hrs	22 mm
9 hrs	22 mm
12 hrs	22 mm

3.5 CUENTA BACTERIANA. (3F)

3.5.1 Material

- Caldo inoculado y ajustado con el tubo 0.5 del nefelómetro.
- Tubos con 9 ml de agua destilada
- Varilla de vidrio doblada en ángulo recto.
- Placas de agar inoculantes.
- Pipetas estériles de 1 ml.

3.5.2 Desarrollo

- Se añadió 1 ml de la suspensión bacteriana ajustada a 9 ml de agua destilada, dil.10 (1-1)
- Se añadió 1 ml de la dilución anterior con 9 ml de agua destilada estéril, dil.10 (1-2)
- Se repitió esta operación hasta la dilución 10 (1-6)
- Para cada dilución se inoculó una placa, añadiendo 1 ml de inóculo a la superficie del agar.
- Se extendió éste inóculo sobre la superficie de la placa con una varilla de vidrio doblada en ángulo recto previamente flameada con alcohol.
- Se incubaron las placas a 37°C durante 48 hrs.

3.5.3 Resultados

- Este ensayo se corrió por triplicado; En la tabla 3.5 se muestran las lecturas promedio para la copa de referencia 1350

Tabla 3.5 "CUESTA BACTERIANA PROMEDIO" (Con la cepa 1330)

DILUCION	NO. DE COLONIAS
dil.(-1)	mas de 300
dil.(-2)	mas de 300
dil.(-3)	mas de 300
dil.(-4)	mas de 300
dil.(-5)	mas de 300
dil.(-6)	21 colonias

TOTAL DE BACTERIAS=21 millones por ml.

3.4. PRECISION SOBRE LAS MODIFICACIONES A LAS VARIABLES CRITICAS DEL METODO TRADICIONAL DE KIRBY-BALLET CO-81 PARA SU UTILIZACION CON Brucella_spp.

3.4.1 MEDIO DE CULTIVO:

Por el crecimiento observado en los tubos con medio liquido (Tabla 3.1) podemos concluir que el caldo brucela cubre mejor los requerimientos nutricionales de Brucella_spp.

En lo que se refiere a los medios sólidos el agar Mueller-Hinton de Dixon queda descartado pues presenta un crecimiento muy pobre. Por otra parte los medios Mueller-Hinton de Dixon y el Inocensitest de Oxoid presentan a simple vista un crecimiento igual (Tabla 3.2). Así pues se tuvo que utilizar otro criterio para determinar el medio adecuado esta consistió en lo siguiente:

Ya que se se pretendía estandarizar el método de K-B con los agentes antimicrobianos normalmente utilizados para el tratamiento clínico de la brucelosis y entre los fármacos a probar se tenían sulfonamidas, es importante señalar que, para pruebas de sensibilidad con dichas sustancias se recomendó utilizar un medio con una concentración baja en tiacina (límite máximo .00004 gr por lit), esta característica la cubre mejor el medio INOCENSITEST de OXOID.

Por sus características óptimas para el crecimiento de Brucella_spp y por no presentar interferencia para la acción de las sulfonamidas se utilizó el medio Inocensitest para todas las pruebas con el fin de mantener las mismas condiciones, en lo que al medio de cultivo se refiere.

3.4.2 EDAD DE LA CEP:1

En la tabla 3.3 se tiene que a las 24 hrs no existe un crecimiento importante por lo que se concluye que el microorganismo se encuentra en su fase LAG .

A las 30 horas se observó que la división celular ha comenzado pues se obtiene una turbidez mayor que a las 24 hrs,esto es, se encuentra en su fase logarítmica.

Normalmente se considera que el tiempo de crecimiento de la brucela es de 48 hrs así que de éste, se avanza en la fase estacionaria que conduce finalmente a la muerte celular.

Aún cuando la mayor densidad de bacteria se obtiene a las 48 hrs se ha elegido el cultivo de 30 hrs,por encontrarse aquella en su fase de máximo desarrollo,resultando muy probable que, cuando se pase de medio (tubo + caldo---medio sólido) que implica el método de Kirby-Bauer , el tiempo de adaptación del cultivo de 30 hrs a las nuevas condiciones sea menor que el requerido por el de 48 hrs., esto es, se pretende disminuir el periodo de retraso del crecimiento de la brucela debido a las condiciones desfavorables producidas al final del cultivo de 48 hrs o mas, como por ejemplo,la acumulación de productos tóxicos.

Al disminuir la fase de adaptación se acumularán rápidamente los enzimas y metabolitos intermedarios hasta alcanzar concentraciones suficientes para que el crecimiento se reinicie, y la síntesis de material celular alcance una fase constante llegando así a su fase logarítmica antes de la aplicación de los discos de antibióticos.

3.4.3 TIEMPO DE PREINCUBACION:

Según el templete utilizado como referencia cuando se utiliza el método de Kirby-Bauer estandarizado, un microorganismo susceptible a la tetraciclina presenta un diámetro de inhibición de aproximadamente 20 mm (2) ya que la Brucella sp. es susceptible a la tetraciclina y a las 7 hrs se tiene un diámetro de 22 mm (Tabla 3.4) el cual es muy cercano al de referencia y que, al obtener diámetros de este tamaño, es posible efectuar fácilmente la lectura sin problemas de traslape de los halos. Este tiempo de preincubación se fijó como el estándar para hacer las pruebas con las diferentes cepas de Brucella sp.

3.4.4 TEMPERATURA DE INCUBACION:

Como se ha venido mencionando, la Brucella es considerada como una bacteria fastidiosa o de difícil crecimiento, una temperatura menor a la óptima (37° C) produciría un retardo en el crecimiento con el consecuente aumento de las zonas de inhibición y, por otra parte una temperatura mayor puede llegar a inhibir el crecimiento teniendo ello el mismo efecto sobre los halos, que una baja temperatura.

Como el fenómeno que se busca contrarrestar con la adaptación del método de Kirby-Bauer para Brucella sp. es precisamente el de obtener halos de tamaño exagerado, se eligió la temperatura de 37° C como fija, para las pruebas con los distintos antibióticos.

3.4.5 DENSIDAD DEL INÓCULO:

Un inóculo muy ligero, producirá zonas de inhibición largas y podríamos concluir falsamente que un M.O resistente es sensible.

Lo contrario sucederá si se utiliza una densidad mayor, se reducirá el diámetro de inhibición y podríamos clasificar un organismo susceptible como resistente. La densidad que normalmente se utiliza por el método de Kirby-Bauer corresponde al tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland (el cual equivale a una densidad de 300 millones de bacterias por el (cc) ha demostrado ser, en las prácticas de rutina para diversos microorganismos como St. aureus y E. coli entre otros, la ideal para esta prueba. Es por esto, que se eligió esa densidad como la estándar.

3.3.4 SELECCION DE LOS ANTIBIOTICOS:

Se usaron los antibióticos más empleados en la terapia de la brucelosis a las concentraciones comerciales. Puesto que la concentración del antibiótico en el disco determina el diámetro de inhibición, se recomienda controlar su potencia cada dos semanas con la cepa de referencia 1330 la cual debe mostrar un halo constante.

Es importante que los antibióticos se saquen del refrigerador 2 horas antes de ser utilizados, ya que un diferencial de temperatura grande entre la de estos y la del laboratorio, causará un cambio en la concentración de los discos por condensación.

Debemos señalar que todo cambio en la potencia de los discos distorsiona los resultados y que todas las pruebas deben realizarse bajo las mismas condiciones ya que se pretende estandarizar el método.

En la tabla N, se muestran las variaciones hechas al método de Kirby-Bauer (K-B) para su uso específico para Brucella spp en comparación al método tradicional.

TAREA 8

COMPARACION ENTRE EL METODO TRADICIONAL DE KIRBY BAUER Y SU MODIFICACION ESPECIFICA PARA BRUCELLA SPP.

	METODO TRADICIONAL	MODIFICACION PARA BRUCELLA
INOCULACION EN CALDO	INOCULAR EN CALDO CASEINA DE SOYA INCLUBAR 2 HRS A 37°C	SEMBRAR EN TUBO DE AGUA INCLINADO INCLUBAR 30 HRS A 37°C MORSEAR CALDO BRUCELLA INCLUBAR 2 HRS A 37°C
ANALISIS DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA	UTILIZAR EL TUBO V.5 DEL NEFELOMETRO	UTILIZAR EL TUBO V.5 DEL NEFELOMETRO
SEMBRAR EN PLACA	UTILIZAR AGUA PULLER HIGHTON	UTILIZAR AGUA MOBLE Y MEDIO ISOSENSITEST INCLUBAR 2 HRS A 37°C
ELABORACION DE LOS DISCOS	CINCO DISCOS POR CADA DE 10X100 MM INCLUBAR 18 HRS A 37°C MEDIR HALOS DE INHIBICION	CINCO DISCOS POR CADA DE 10X100 MM INCLUBAR 18 HRS A 37°C MEDIR HALOS DE INHIBICION

CAPITULO IV.

"MATERIAL Y METODOS III"

"ENSAJO DEL METODO DE KIRBY-BAUER PARA SU USO ESPECIFICO CON CEPAS AISLADAS DE Brucella sp"

Una vez adaptado el método de Kirby-Bauer para su utilización específica con Brucella, se ensayó esta modificación con 108 cepas proporcionadas por el ISET (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos).

4.1 Material

- Cepas de Brucella proporcionadas por el Laboratorio de Brucelosis del ISET de la Secretaría de Salud.
- Discos de antibióticos (se utilizaron discos comerciales de concentración estándar).

Clorotetraciclina	30 mcg = A30
Gentamicina	150 mcg = G150
Sulfatetraciclina	30 mcg = T30
Kanamicina	30 mcg = K30
Estreptomicina	10 mcg = E10
Rifampicina	5 mcg = R5
Aminiacina	30 mcg = A30
Tetraciclina	30 mcg = T30
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25 mcg = M25

- Placas con medio Inocensitest de Dado
- Estándar turbidimétrico. Tubo 0.5 del nefelómetro
- Hisopos estériles
- Agitador Vortex
- Tubos con agar H
- Tubos con lapón de resaca con caldo brucela estériles
- Ansa bacteriológica tratada con alcohol por 20 minutos y flameada
- Pinzas estériles

4.2 Descripción del método de Kirby-Bauer para su uso específico con Brucella spp. (Para cada cepa se corrió este ensayo por duplicado)

- Se sembró la cepa en tubo de agar inclinado y se incubó a 37°C durante 30 horas.
- Pasado este tiempo, se le agregó caldo brucela y se incubó a 37°C por 2 hrs
- Se ajustó la densidad de bacteria comparando con el tubo.5 del nefelómetro, esta lectura se realizó junto a una fuente de luz y el tubo se colocó contra un fondo blanco marcado con líneas de colores.
- Se tomó el inculo ajustado con un hisopo.
- Se pasó el hisopo por toda la superficie de la placa, repitiendo esta operación 3 veces girando la caja 60° grados entre cada pasada y una pasada final por todo el borde de la superficie del agar.
- Se incubó durante 7 hrs a 37°C

- Se colocaron los discos (5 por caja de 10 X 100 ml) procurando una distribución uniforme y tratando que los discos se encontraran a una distancia al borde de la caja de por lo menos 15 mm.
- Se incubó durante 18 hrs a 37°C.
- Se midieron los diámetros de inhibición obtenidos.

4.3 Resultados

En la tabla 4, se enlistan los diámetros de inhibición obtenidos con el método que se acaba de describir (las lecturas están expresadas en milímetros).

Las claves utilizadas en la columna de clasificación significan lo siguiente:

BN - Brucella abortus

BS - Brucella suis

BA - Brucella abortus

Los números que siguen a cada una de estas claves se refieren a la localidad a la cual pertenecen.

El significado de las claves de procedencia son:

INBT - Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicas

ITC - Instituto Tecnológico

- CI-25 - Clínica número 25
 H.Gral - Hospital General
 CMN - Centro Médico Nacional
 SS - Seguro Social
 HIR - Hospital de Infectología de La Raza
 IMP - Instituto Nacional de Pediatría

La H y la R que siguen a cada una de las claves indican que fueron aisladas de un *Streptococcus* (H) o animal (A).

Finalmente las claves para los antibióticos con sus concentraciones correspondientes son:

Clorotetraciclina	30 mcg = A30
Gentamicina	150 mcg = G150
Oxitetraciclina	30 mcg = T30
Kanamicina	30 mcg = K30
Estreptomisina	10 mcg = E10
Rifampicina	5 mcg = R5
Amikacina	30 mcg = AK30
Tetraciclina	30 mcg = T30
Trimetoprima-Sulfametoxazol	35 mcg = TM35

TABLE 4.

TABLE OF CHANGES IN ABUNDANCE FOR THE ASSOCIATION OF THE MOUND OF 6-1 CORRECTED FOR THE SEASON IN WHICH

Year	PRECEDENCE	CLASSIFICATION	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948
1	1941-4	89-1	21	48	26	13	17	13	23	23	0
2	1941-4	89-1	20	48	23	10	20	14	23	27	0
3	1941-4	89-1	24	48	23	10	40	20	20	23	0
10	1941-4	89-1	20	7	23	7	7	13	20	14	0
12	1941-4	89-1	10	40	26	13	14	10	13	13	0
15	1941-4	89-1	24	10	23	10	40	20	20	23	0
16	1941-4	89-1	27	13	20	14	40	21	13	26	0
17	1941-4	89-1	24	40	23	10	40	23	23	26	0
18	1941-4	89-1	17	20	14	10	21	23	20	10	0
19	1941-4	89-1	10	13	23	10	20	13	23	20	0
20	1941-4	89-1	24	14	23	13	40	20	21	20	0
25	1941-4	89-1	20	17	10	14	17	20	13	23	0
26	1941-4	89-1	24	14	23	13	40	14	23	20	0
28	1941-4	89-1	17	20	20	14	21	20	20	14	0
29	1941-4	89-1	20	13	7	10	14	10	12	27	0
30	1941-4	89-1	20	21	17	11	20	20	20	24	0
33	1941-4	89-1	15	17	21	13	20	13	20	17	0
34	1941-4	89-1	20	13	10	20	20	10	12	20	0
40	1941-4	89-1	25	20	23	11	21	24	20	20	0
42	1941-4	89-1	11	7	10	12	11	13	10	11	0
54	1941-4	89-1	10	10	17	10	17	17	10	21	0
60	1941-4	89-1	17	13	20	10	21	23	24	24	0
63	1941-4	89-1	10	10	23	14	21	20	23	24	0
66	1941-4	89-1	13	11	7	7	7	10	10	10	0
73	1941-4	89-1	27	10	13	13	21	13	24	13	0
77	1941-4	89-1	24	21	17	10	13	20	20	17	0
80	1941-4	89-1	20	10	23	10	14	10	20	20	0
81	1941-4	89-1	20	10	23	10	14	10	20	20	0
82	CL - 25-4	89-1	24	10	23	10	20	13	20	10	0
84	CL - 25-4	Brucella spp.	10	10	4	12	4	13	12	10	0
104	1941-4	89-1	24	21	10	10	20	23	23	27	0
105	1941-4	89-1	20	13	24	12	21	17	20	24	0
107	1941-4	89-1	20	21	20	10	21	20	20	24	0
108	1941-4	89-1	20	20	23	10	23	23	20	20	0
109	CL - 25-4	Brucella spp.	20	17	23	10	17	21	23	24	0
110-112	1941-4	89-1	23	20	17	10	20	4	23	27	0
110	1941-4	89-1	20	27	17	10	21	23	20	24	0
111	1941-4	89-1	25	20	23	20	17	20	23	24	0
112	1941-4	89-1	25	17	23	10	17	10	20	24	0
113-114	1941-4	89-1	27	20	24	10	20	10	24	24	0
113	1941-4	89-1	27	20	24	10	20	10	24	24	0
114	1941-4	89-1	27	20	24	10	20	10	24	24	0
115	1941-4	89-1	25	17	23	17	17	15	27	24	0
116	1941-4	Brucella spp.	20	17	23	11	21	4	10	24	0
117	1941-4	89-1	24	23	17	10	13	23	23	24	0
118	1941-4	89-1	17	17	24	10	21	20	20	20	0
119	1941-4	Brucella spp.	20	20	23	10	21	20	20	24	0

Tabla 4.
 TABLA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN CON LA MODIFICACIÓN DEL NIVEL DE 0-6 ESPECIALIZADA PARA EL MANEJO BRUCELLA

CLAVE	POSIBILIDAD	CLASIFICACION	SEM	ESD	MS	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10
25-01	01-25-a	MS-1	32	20	15	30	20	25	08	18	0			0
25-02	01-25-a	MS-1	28	21	31	08	25	17	33	24	4			0
25-03	01-25-a	MS-1	25	07	14	08	08	22	17	26	4			0
25-04	01-25-a	MS-1	26	18	10	14	18	20	24	27	0			0
25-05	01-25-a	MS-1	28	18	21	17	21	21	21	27	0			0
27-01	01-25-a	MS-1	28	20	20	11	20	20	20	20	0			0
01-01	MS-0	MS-0	02	16	17	11	18	12	14	23	0			0
01-02	MS-0	MS-0	24	18	18	14	19	20	24	22	0			0
01-03	MS-0	MS-0	25	18	22	20	22	13	21	17	0			0
01-04	MS-0	MS-0	21	19	20	15	19	21	21	24	0			0
01-05	MS-0	MS-0	14	12	8	9	15	18	15	15	0			0
01-06	MS-0	MS-0	20	17	20	20	21	27	21	24	0			0
01-07	MS-0	MS-0	17	14	20	17	22	20	24	12	10			0
01-08	MS-0	MS-0	14	11	8	17	14	15	20	15	17			0
01-09	MS-0	MS-0	11	11	11	10	15	16	15	15	0			0
01-10	MS-0	MS-0	24	20	21	08	20	24	20	20	20			0
01-11	MS-0	MS-0	20	17	20	20	21	20	21	20	0			0
01-12	MS-0	MS-0	15	12	12	4	14	17	15	15	0			0
01-13	MS-0	MS-0	27	18	15	10	14	20	17	19	0			0
01-14	MS-0	MS-0	14	12	8	10	15	18	15	15	0			0
01-15	MS-0	MS-0	23	19	20	20	21	24	22	23	0			0
01-16	MS-0	MS-0	14	12	10	08	10	14	17	16	0			0
01-17	MS-0	MS-0	18	12	17	10	17	12	14	16	10			0
01-18	MS-0	MS-0	11	11	20	14	11	17	17	17	0			0
01-19	MS-0	MS-0	18	12	17	10	19	17	14	18	20			0
01-20	MS-0	MS-0	20	17	20	20	21	27	21	24	0			0
01-21	MS-0	MS-0	20	18	20	20	21	27	21	17	0			0
01-22	MS-0	MS-0	20	17	20	20	21	27	21	25	0			0
01-23	MS-0	MS-0	24	18	20	20	16	25	08	24	0			0
01-24	01-25-a	MS-1	24	20	20	20	21	27	21	24	0			0
01-25	01-25-a	MS-1	24	16	15	4	18	20	08	20	0			0
01-26	MS-0	MS-0	18	15	15	08	08	13	18	17	0			0
01-27	01-25-a	MS-1	25	19	20	17	21	27	21	17	0			0
01-28	01-25-a	MS-1	20	20	27	08	22	27	23	20	0			0
01-29	01-25-a	MS-1	22	12	15	10	18	24	17	15	0			0
01-30	01-25-a	MS-1	24	12	17	4	17	22	21	15	0			0
01-31	01-25-a	MS-1	27	20	18	20	19	18	08	18	0			0
01-32	01-25-a	MS-1	24	17	18	4	18	20	17	24	0			0
01-33	01-25-a	MS-1	22	21	14	4	22	20	20	20	0			0
01-34	01-25-a	MS-1	19	16	24	4	8	17	18	20	0			0
01-35	MS-0	MS-0	25	25	24	11	20	20	21	18	0			0
01-36	MS-0	MS-0	20	12	17	08	17	22	17	15	0			0
01-37	MS-0	MS-0	25	19	25	22	22	17	23	17	0			0
01-38	MS-0	MS-0	20	12	20	08	23	24	25	20	0			0
01-39	MS-0	MS-0	20	14	17	4	12	11	10	17	0			0
01-40	MS-0	MS-0	20	23	24	20	20	20	13	20	0			0
01-41	MS-0	MS-0	27	20	18	20	19	08	18	18	0			0
01-42	MS-0	MS-0	20	20	24	11	21	20	21	18	0			0
01-43	MS-0	MS-0	18	14	15	4	15	14	11	17	0			0
01-44	MS-0	MS-0	25	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-45	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-46	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-47	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-48	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-49	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-50	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-51	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-52	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-53	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-54	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-55	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-56	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-57	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-58	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-59	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-60	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-61	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-62	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-63	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-64	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-65	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-66	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-67	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-68	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-69	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-70	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-71	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-72	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-73	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-74	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-75	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-76	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0
01-77	MS-0	MS-0	20	18	20	21	22	19	21	18	0			0

TABLE 4.

TABLE OF PARAMETERS OF REGRESSION FOR THE APPLICATION OF THE METHOD OF P-E SPECIFIC FOR THE SEVERAL MODELS

CLASS	PRODUCTION	CLASSIFICATION	TCM	CSM	MS	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9
87-120	187-0	88-1	17	30	16	11	11	22	15	30	19	30	19
8-202	111-4	84-1	21	11	25	11	21	18	10	30	9	30	9
100-2	111-4	84-1	25	31	24	19	21	29	19	31	9	31	9
8-11	100-3	88-1	11	08	21	11	21	22	11	29	0	29	0
valor promedio			11.81	11.29	18.10	11.81	11.88	18.17	18.41	18.88	9.81	18.88	9.81
valor maximo			11.88	11.88	28.88	11.88	11.88	28.88	28.88	28.88	28.88	28.88	28.88
valor minimo			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
desviacion estandar			1.91	1.07	1.32	1.21	1.19	1.28	1.31	1.15	1.21	1.15	1.21

CAPÍTULO V

"INTERPRETACION DE RESULTADOS"

En este capítulo se muestran los rangos de clasificación del método convencional de Kirby-Bauer extrapolados a la modificación ensayada para su uso específico con Brucella spp., así como el porcentaje de cepas encontradas en cada categoría para cada uno de los antibióticos probados.

TABLA 5.1-RANGO DE CLASIFICACION DE LAS CEPAS EN FUNCION DEL DIAMETRO DE DIFUSION PARA LOS DISTINTOS ANTIBIOTICOS UTILIZADOS.*

ANTIBIOTICO	DIAMETROS DE CLASIFICACION (mm)		
	RESISTENTE	INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
TETRACICLINA	<=14	15-18	>=19
ESTREPTOMICINA	<=11	12-14	>=15
TRP-SRE	<=10	11-13	>=16
AMORACINA	<=14	15-16	>=17
OXITETRACICLINA	<=14	15-18	>=19
ISVANOMICINA	<=13	14-17	>=18
CLOROTETRACICLINA	<=14	15-18	>=19
GENTAMICINA	<=12	13-14	>=15
RIFAMPICINA	***	***	***

*** No está reportada en la bibliografía

TABLA 5.2 "PORCENTAJE DE CEPAS EN LAS DIFERENTES CATEGORIAS".

ANTIBIOTICO	RESISTENTE	NUMERO DE CEPAS INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
TETRACICLINA (13)	6 5-6	12 11,32	88 80,01
ESTREPTOMICINA (15)	9 6-4	15 14,15	82 77,3
TRP-SMC (13)	20 15,38	31 27,24	83 81,9
AMIKACINA (13)	10 9,1	6 5,4	90 84,9

Tabla 5.2 "PORCENTAJE DE CEPAS EN LAS DIFERENTES CATEGORIAS".

ANTIBIOTICO	RESISTENTE	NUMERO DE CEPAS INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
OXITETRACICLINA (3)	17 16.03	13 14.15	74 69.8
KANAMICINA (3)	8 4.7	13 14.1	86 81.1
CLOROTETRACI- CICLINA (3)	6 5.6	20 18.86	80 75.47
GENTAMICINA (3)	102 96.2	0 0	4 3.7

CAPÍTULO VI

"DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES".

El método de Kirby-Bauer normalmente no es utilizado ni para bacterias fastidiosas ni para bacterias de crecimiento lento, ya que el método tradicional da resultados falsos para las bacterias, parecen ser más susceptibles a los distintos antibióticos debido a que el fármaco tiene mucho tiempo para difundirse antes que el crecimiento bacteriano comience. Esto, lógicamente se refleja en diámetros exagerados de inhibición que no tendrán ningún significado ni cualitativo ni cuantitativo.

Sin embargo, en el presente trabajo se ensayó una modificación a este método para Brucella spp, ya que se observó que, a pesar de ser un microorganismo clasificado como fastidioso, éste presenta un tiempo de crecimiento estable y uniforme. Por eso, se adecuó el método a las condiciones óptimas de crecimiento para dicha especie y se utilizaron cepas de 30 hrs. buscando así la disminución del periodo de retardo del crecimiento bacteriano en placa. Además, se permitió el crecimiento de Brucella spp durante 7 hrs antes de colocar los discos, tratando de esta forma, que el crecimiento de Brucella spp se encontrara ya en su fase logarítmica, en el momento del inicio de la difusión del antibiótico, tal como teóricamente se considera que sucede en el ensayo tradicional de Kirby-Bauer cuando se corre con bacterias de crecimiento rápido .

La adaptación del método se logró considerando las siguientes modificaciones al método convencional:

- Utilizar caldo Brucella en vez de caseína de soya.
- Utilizar para el sembrado en caja el medio Inocensitest de Desid.
- Realizar el ensayo con cepas de 30 hrs de edad
- Una vez inoculadas las placas, estas se deben incubar durante 7 hrs. antes de colocar los discos.

Es importante señalar que durante todo el ensayo no se observó la aparición de colonias resistentes dentro de las zonas de inhibición.

En la tabla 3.3 se muestran los porcentajes de resistencia y susceptibilidad obtenidos con las cepas estudiadas para los diferentes antibióticos. En dicha tabla se incluyó una categoría intermedia con el fin de evitar una clasificación incorrecta.

De los resultados obtenidos en dicha tabla se observó que existe para todos los antibióticos, algún grado de sensibilidad aunque esto, se presenta en un rango muy amplio que va desde valores cercanos al 80 % de cepas susceptibles al antibiótico (como se observa en los casos de tetraciclina, estreptomizina, amikacina, kanamicina y clorotetraciclina) hasta sólo un 3,7 % de cepas susceptible en el caso de la gentamicina.

Dichos resultados señalan la importancia que tiene el correr este ensayo para la selección correcta del antimicrobiano que se utilizará para combatir la enfermedad, ya que como se observa en el caso de la gentamicina, la mayoría de las cepas son resistentes y es común encontrar casos de brucelosis tratados con este antibiótico.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Es importante señalar que estas pruebas son solamente cualitativas por tratarse únicamente de ensayos "in vitro".

Se propone que este estudio sea complementado con la prueba de Concentración mínima inhibitoria, la cual se deberá adecuar, al igual que esta, a las condiciones óptimas de crecimiento para Brucella spp.

Finalmente es importante señalar que, como se trata de la modificación de un método, siempre que se utilice deben señalarse las condiciones de trabajo y evitar las siguientes fuentes de error:

- Preparación del medio (principalmente pH)
- Utilización de placas viejas o mal almacenadas
- Biscox mal almacenados o caducos
- Variación de la fuerza de los antibióticos
- Mal ajuste del lámpara
- Errores en la preparación del estándar de referencia
- Variación de los distintos tiempos de incubación
- Temperatura de incubación elevada
- Utilización de atmósfera de CO₂
- Lectura de diámetros prematura
- Transcripción errónea de resultados

-RECOMENDACIONES

Se recomienda que esta prueba se lleve a cabo para la selección correcta del tratamiento farmacológico a seguir para cada caso particular de brucelosis, ya que, como se muestra en los resultados obtenidos, las copas muestran una gran diferencia en la sensibilidad para un mismo antimicrobiano. El realizar el presente ensayo como

prueba rutinaria una vez que se ha confirmado clínicamente que la brucela es el agente etiológico responsable del cuadro sintomático de un individuo, disminuirá la aparición de cepas resistentes, facilitando la erradicación de la enfermedad, y previniendo la aparición de casos de brucelosis crónica.

Además, se evitará de esta forma el uso indiscriminado de antibióticos, lo cual normalmente implica la aparición de algunos efectos colaterales indeseables en el paciente que se encuentra bajo tratamiento, que como ya se indicó en este trabajo, actualmente representa uno de los mayores problemas de salud mundial.

APENDICE A.

"PREPARACION DE MEDIOS Y REACTIVOS"

-CALDO BRUCELA.

COMPOSICION DEL MEDIO:(Para 1000 ml de agua destilada)

- Peptona de Caseina.....10.0 gr
- Peptona de Carne.....10.0 gr
- Dextrosa.....1.0 gr
- Extracto de Levadura.....2.0 gr
- Cloruro de Sodio.....8.0 gr
- Bisulfito de Sodio.....0.1 gr

PREPARACION

Se disuelven 20 gr de caldo brucela en un litro de agua destilada, se pone en frascos de vidrio tapados con algodón y se esterilizan a 15 lb durante 15 minutos.

-PLACAS DE AGAR BRUCELA:

PREPARACION:

Se disuelven 28 gr de caldo brucea y 20 gr de agar con 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con buffer de fosfatos y se esteriliza a 15 lb durante 15 minutos.

Una vez estéril se distribuye en cajas estériles.

- PLACAS DE AGAR BRUCELA CON 10% DE SUERO. (Se recomienda utilizar suero equino o bovino)

PREPARACION:

Se disuelven 28 gr de caldo brucea y 20 gr de agar en 700 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza a 15 lb durante 15 minutos. Ya estéril se deja enfriar y poco antes de que solidifique se le adiciona suero de caballo esterilizado por filtración, se homogeniza y se distribuye en cajas estériles.

- TUBOS DE AGAR BRUCELA

Se prepara el agar brucea. Se llenan los tubos con 3 ml del medio, se tapan con algodón y se esterilizan en autoclave a 15 lb durante 15 minutos. Una vez estériles, se dejan enfriar colocados en posición inclinada.

- FRASCOS SEMILLA CON AGAR H.

COMPOSICION DEL MEDIO. Por cada 1000 ml de agua destilada.

- Extracto de carne.....3.0 gr
- Lacto caseína.....5.0 gr
- Lacto peptona.....5.0 gr
- Lacto dentrosa.....1.0 gr
- Difosfato de potasio.....2.5 gr
- Cloruro de sodio.....5.0 gr

PREPARACION:

Se disuelven 21.5 gr de caldo H y 35 gr de agar en un litro de agua, se verifica el pH= 6.5 y en caso necesario se ajusta con buffer de fosfatos. Los frascos semilla se llenan con 10- 15 ml del medio y se tapan con algodón. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.

- BOTELLAS ROUS CON AGAR H.

Una vez preparado el medio, las botellas se llenan con 175 ml de éste, se tapan con tela y papel aluminio y se esterilizan a 15 lb durante 20 minutos.

-TUBOS CON AGAR H.

Una vez preparado el medio se vacían 3 ml de éste en tubos y se esterilizan a 15 lb durante 20 minutos.

-BACTOCASEITINE:

COMPOSICION DEL MEDIO. Para 1000 ml de agua destilada.

- Digesto pancreático de caseína para uso bacteriológico.

PREPARACION:

Se disuelven 25 gr de bactocaseitine y 10 gr de glutamato monosódico en un litro de agua, esta solución se filtra y en seguida se le adicionan 50 gr de azúcares, se distribuye en frascos con tapón de rosa y se esterilizan a 15 lb durante 15 minutos.

- PLACA DE AGAR MUELLER HINTON:

COMPOSICION DEL MEDIO. Para 1000 ml de agua destilada.

- Infusión de carne de res.....300.0 gr
- Peptona de caseína ácida.....17.3 gr
- Almidón.....1.5 gr
- Agar-Agar.....17.3 gr

Efectuar una suspensión del medio, según las recomendaciones del proveedor mezclando bien, calentando y agitando constantemente, se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza a 15 lb durante 15 minutos.

Una vez que el medio se ha enfriado se vierten en las cajas de 10x100 cm. 30 ml del mismo de forma que se obtenga una superficie totalmente horizontal.

Después que el medio se ha solidificado por completo a temperatura ambiente y en caso que las cajas no se utilicen inmediatamente se sellan con plástico y se refrigeran a una temperatura entre 2 y 8 C.

- TUBOS CON TAPON DE ROSCA CON CLAVO DE CASEINA DE SOYA.

COMPOSICION DEL MEDIO. Para 1000 ml de agua destilada.

- Caseína de soya.....17.0 gr
- Cloruro de sodio.....9.0 gr
- Fosfato dipotásico.....2.5 gr
- Agua destilada.....1000.0 ml

PREPARACION:

Efectuar la suspensión calentando si es necesario, a cada tubo se le agregan 3 ml. se tapan con tapón de rosca y se esterilizan a 15 lb durante 15 minutos.

-PLACA CON MEDIO ISOSENSITIZANTE DE OXIDO LTV.

COMPOSICION DEL MEDIO. Para 1 000 ml de agua destilada.

- Caseína hidrolizada.....1.0 gr
- Peptona.....3.0 gr
- Dextrosa.....3.0 gr
- Cloruro de sodio.....3.0 gr
- Aislón soluble.....1.0 gr
- Difosfato de sodio.....2.0 gr
- Acetato de sodio.....1.0 gr
- Glicerofosfato de magnesio.....0.2 gr
- Óxido de calcio.....0.1 gr
- $CaSO_4$0.001 gr
- $CuSO_4$0.001 gr
- $ZnSO_4$0.001 gr
- Monodiona.....0.002 gr
- Cianocobalamina.....0.001 gr
- Hidrocloruro de L-cisteína.....0.001 gr
- L-triptófano.....0.02 gr
- Piridoxina.....0.02 gr
- Pantotenato.....0.003 gr
- Nicotinamida.....0.003 gr
- Tiamina.....0.003 gr
- Biotina.....0.0004 gr
- Inositol.....0.0004 gr
- Adenina.....0.01 gr
- Guanina.....0.01 gr

- Xantina.....0.01 gr
- Uracil.....0.01 gr
- Agar # 10.0 gr

PREPARACION:

Se disuelven 20.4 gr del medio y 20 gr de agar noble con 1000 ml de agua se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza a 15 lb durante 15 minutos.

- SOLUCION SALINA FENOLADA.

Pesar 0.05 gr de NaCl y disolver en 100 ml de agua destilada, añadir 0.5 gr de fenol, agitar y colocar en un recipiente limpio. Finalmente esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

-REACTIVOS PARA TINCION DE GRAM:

- SOLUCION MADRE DE CRISTAL VIOLETA

20 gr de cristal violeta insoluble al 85%
100 ml de alcohol etilico al 70%

- SOLUCION MADRE DE IODATO

1 gr de iodato de sodio
100 ml de agua destilada

Diluir la solución madre de cristal violeta en proporción 1 a 10 con agua destilada y mezclar con 4 volúmenes de solución madre de

oxalato. Guardar en frascos con tapón de vidrio.

- SOLUCIÓN DE YODO DE GRAM

1 gr de cristales de yodo

2 gr de yoduro de potasio

Diluir completamente en 5 ml de agua destilada y agregar:

240 ml de agua destilada

60 ml de bicarbonato de sodio, solución acuosa al 5%

Mecilar bien, guardar en un frasco de vidrio color amber.

- DECOLORANTE

250 ml de alcohol etílico

250 ml de acetona

Mecilar bien y guardar en frasco con tapón de vidrio.

- CONTRACOLORANTE.

3.5 gr de safranina

100 ml de alcohol etílico del 95

Diluir la safranina madre en proporción 1 a 5 con agua destilada, guardar en frasco con tapón de vidrio.

REACTIVOS PARA TINCION DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA POR GRAM*

- Fucsina básica de la coloración de Ziehl Neelsen diluida 1:10 con agua destilada y filtrada. (solución madre se prepara con 1 gr de fucsina básica en 10 ml de alcohol absoluto y agregar 90 ml de solución de fenol al 5%).
- Ácido acético al 0.5 % v/v
- Verde de malaquita al 0.5 % v/v

- PATRONES DEL NEFELOMETRO DE MC FARLAND

1) Preparar 10 tubos de ensayo de igual tamaño, nuevos, perfectamente limpios y enjuagados.

2) Preparar ácido sulfúrico químicamente puro al 1X

3) Preparar una solución estanca al 1X de cloruro de bario químicamente puro.

4) Agregar la cantidad indicada de estas soluciones tal como lo indica el cuadro A-1 hasta tener un total de 10 ml por tubo.

5) Cerrar hermeticamente los tubos. El precipitado de sulfato de bario en suspensión corresponde aproximadamente a la densidad de células homogéneas de E. coli por ml, según la serie de patrones que se puede ver en el cuadro A-1.

CUADRO A-1'
 PATRONES DEL NEPELOMETRO DE MC FARLAND

	Numero de tubo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BuCl2 (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
H2SO4 (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad										
celular	3	6	7	12	15	18	21	24	27	30
$\times 10^6$ ml										

BIBLIOGRAFIA:

1. Abdussalam, H., Feig, D.A.
BRUCELLA AS A WORLD PROBLEM , International Symposium on
Brucellosis (III), Rabat 1975.
2. Anon. GUIDELINES FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING.
WHO-LAB-87.1
3. Bailey-Scott,
DIAGNOSTIC MICROBIOLOGICO, SEXTA EDICION
Editorial Medica Panamericana ,Buenos Aires 1983.
4. Barry, A.L
THE ANTIMICROBIC SUSCEPTIBILITY TESTING-PRINCIPLES AND PRACTICES
Lee & Febiger, Philadelphia, USA, 1976
5. Barry, A.L., Badal, R.E
STABILITY OF MINOCYCLINE, DOXYCYCLINE, AND TETRACYCLINE STORED IN
AGAR PLATES AND MICRODILUTION TRAYS.
Current Microbiology; Springer-Verlag, New York 1978

6. Barry, L., Thornberry, G.

SUSCEPTIBILITY TEST, DIFFUSION TEST PROCEDURES

The antimicrobial susceptibility testing

Lee & Feibiger, Philadelphia, USA, 1976.

7. Bauer, A.W. Kirby, R.D.

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING BY STANDARDIZED SINGLE DISK METHOD.

The American Journal of Clinical Pathology, Vol.48, No 4

The Williams & Wilkins Co., USA, 1966

8. Benitz, K.P., Dienerer.

RENAL TOXICITY OF TETRACYCLINE DEGRADATION PRODUCTS.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med 115:930-935 USA 1964

9. Bertrand, A. Jansuet, D.

TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE DE LA BRUCELLOSE

See Rep. 58, No 5, p 261-263

Paris 1962.

10. Sashy, S.R.H.,

TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE: IN VITRO MICROBIOLOGICAL ASPECTS.

Journal of Infectious Diseases, 130a, p442.

Chicago, 1970.

11. Casillas, R. A.

IMPACTO DE LA BRUCELOSIS EN LA SALUD PUBLICA DE MEXICO.

Foro Nal. sobre brucelosis, Mexico 1969

12. Conn, E. P., Easton.

THE EFFECT OF TETRACYCLINE ON THE FUNCTION AND STRUCTURE OF THE LIVER.

Antibiotics annual, 1955-1956, PP. 825-830.

Medical Encyclopaedia, New York 1956.

13. Cooper, K. E., Linker, R. H.

THE EFFECT OF INOCULUM SIZE ON INHIBITION ZONES IN AGAR MEDIA USING STREPTOCOCCI AND STREPTOMYCIN.

J. Gen. Microbio., 18:670-687, USA 1958.

14. Cortés, S.

LOS BIOLÓGICOS Y SU PAPEL EN EL COMBATE DE LA BRUCELOSIS.

Foro Nal. sobre brucelosis, México 1969.

15. Barnet, J. H., Barnet, L. P.

FRONTHOPRIN: LABORATORY AND CLINICAL STUDIES.

J. Clin. Pathol., 21:202 USA 1968.

16. Del Rio, J.A.
IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS EN MEXICO.
Fero Nal. sobre brucelosis, México 1968.
17. De Rycke, J.
EFFECT OF RIFAMPICIN AND TETRACYCLINE ALONE AND IN COMBINATION
AGAINST BRUCELLA SUIIS.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)
1980, 131 B, 277-287
France 1980
18. Dubray, G., Plassart, R.
CARACTERISATION DES FRACTIONS ET PROPRIETES BIOLOGIQUES.
(1975) International symposium on brucellosis(113).
Develop.biol.standard.,Vol 31,pp68-91
1975, Basel.
19. Flores, G.R.
CARACTERISTICAS DE LA BRUCELOSIS EN BOVINOS.
Fero Nal. sobre brucelosis, México 1968.
20. Guel, L.F.
PROGRAMA OFICIALES PARA EL CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN MEXICO.
Fero Nal. sobre brucelosis, México 1968.

21. Balseffret, A.A., Dinec, E.H.

IN VITRO ACTIVITY OF M-FORRIBICOL THIAMINICON AGAINST 90
CLINICAL ISOLATES OF BRUCELLA MELITENSIS COMPARED WITH THOSE OF
CEPHERITIN, RIFAMPIN, TETRACYCLINE, AND CO-TRIMOXAZOLE.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p 501-503
Madrid, 1982.

22. Figueroa, J.

UNUSUAL CASE OF BRUCELLOSIS, BRUCELLAR-HYDRODITES.
1977 Rev.Clin.Exp. Vol 4, 301, 304
USA 1977.

23. Ritchings, G.H.

MECHANISM OF ACTION OF TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE
The Journal of Infectious Diseases. Vol 128
USA 1983

23a. Javets, E., Heinsick, J.L., Adalberg, E.A.

MICROBIOLOGIA MEDICA (decaava edición)
Ed. El Manual Moderno
México, D.F. 1987

24. Jones, R.H., Barry, A.L.
SUSCEPTIBILITY TEST: MICRODILUTION AND MACRODILUTION BROTH
PROCEDURES.
The antimicrobial susceptibility testing.
Lee & Febiger
Philadelphia, USA 1976
25. Lennet
MICROBIOLOGÍA MÉDICA
Ed. Salvat, 1980
26. Leynaola, D.
MÉTODO ACTUAL DE PREPARACION DE ANTÍGENOS DE BRUCELLA ABORTUS Y
PRUEBAS MAS RECIENTES DE DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN EL HOMBRE Y
EN LOS ANIMALES.
TESIS UNAM 1988.
27. López, R.A.
TERAPIA EN LA BRUCELOSIS HUMANA.
Foro Nal. sobre Brucelosis.
México 1988.
28. LOTUS 123 USER'S MANUAL

27. Cienega-Torres, J. Suspects, K.R.

MUCOCLEIDIS TREATED WITH RIFAMPICIN.

Proc Natl. Acc. 1970 45:335-40

Harper & Row

USA 1970

28. Mac Fadden

PRUEBAS SEROTIPICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE
IMPORTANCIA CLINICA.

Editorial medica panamericana, 1969, Mexico.

29. Mancera, M.A.

EXPERIENCIAS SOBRE LA TERAPIA DE LA BRUCELLOSIS.

Proc Natl. sobre Brucelosis.

Mexico 1968.

30. Meyer, E.P. (1969).

EMIGRATION OF HUMAN B-LYMPHOCYTES ON STRAINED BLOOD SHEARS BY
THEIR BINDING OF BACTERIA.

Clinical Immunopathology. Vol. 1 37-46.

USA 1969.

32. The Merck Index
TENTH EDITION.
Merck & Co., Inc.
Rahway, N.J., USA, 1963
34. Monroy Rosero, M.R.
PENICILLIN SENSITIVE BRUCELLA.
(1963) Thesis OFB UNAH.
35. Morgan, W.J.F., Cabot, R.J.
RECOMMENDATIONS FOR THE DESCRIPTION OF SPECIES AND BIOTYPES OF THE
GENUS BRUCELLA.
(1975) International Symposium on Brucellosis (III).
Developing Biology Standards, Vol. 31, pp.27-34
Basel, 1975
36. Mortensen, E.J. Moore, D.G.
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES OF BRUCELLA.
Diagnostic of Microbiological Diseases.
USA, 1966.
37. Palencia, E., Stern, J.N.
IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF BRUCELLA MELITENSIS TO NEW
CERIALSPORES CROSSING BLOOD-BRAIN BARRIER.
Antimicrobial Agents in Chemotherapy, Jan. 1966 pp.182-183
American Society of Microbiology.
USA 1966.

38. Pionat, R.

BRUCELLA AND BRUCELLOSIS: AN UPDATE.

3rd Forum of microbiology.

Paris 1967.

39. Rizzo-Hausli, J., Genado, H.

RIFAM BRUCELLOSIS: AN EVALUATION OF ANTIBIOTICS IN THE TREATMENT OF BRUCELLOSIS.

Postgraduate Medical J., August 1967, 43, 520-526.

USA 1976.

40. Robertson, L., Farnel, I.D.

THE SENSITIVITY OF BRUCELLA ABORTUS TO CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS.

J. Med. Microbiol. Vol 1973.

USA 1973.

41. Ross, J.

L'ANTIBIENNO-THERAPIE DANS LA BRUCELLOSE CHRONIQUE.

International Symposium on Brucellosis (II).

Dassl 1974.

42. Ruiz-García-Rodríguez, R.

BRUCELOSIS, 3a Ed.

La Prensa Mexicana.

México 1976.

43. Sutherland, V.C.

A SYNOPSIS OF PHARMACOLOGY.

2nd Edition Philadelphia W.B.

USA 1970.

44. Sanchez de la Fuente, E., Ramirez, R.G.

BREVE RESERVA CLINICO-EPIDEMIOLOGICA DE LA BRUCELLOSIS HUMANA EN LA JURISDICCION SANITARIA (TORREON 1960-1967).

Fore Nat. sobre Brucelosis.

México 1966.

45. Sanchez-Rejonada, P.H.R.

BRUCELLA MELITENSIS.

Fore Nat. sobre Brucelosis.

México 1966.

46. Sando, A.S.; Randoll, G.L.

ASPECTOS ANTIBIOTICANTES

Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman y Gilman.

Séptima edición.

Editorial Panamericana

Buenos Aires 1960.

46a. Sheriff, J.C.

PROBLEMS IN "IN VITRO" DETERMINATION OF ANTIBIOTIC TOLERANCE IN CLINICAL ISOLATES.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov. 1985

American Society for Microbiology.

USA 1986.

47. Schultz, J.C. Aklonis, M.W.

FATAL LIVER DISEASE AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF TETRACYCLINE.

New England J. Med. 289:999, 1963.

USA 1963.

48. Stuart, F.A.

COMPARISON OF RIFAMPICIN AND TETRACYCLINE BASED REGIMENS IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL BRUCELLOSIS.

Journal of Infections (1982) 5, 27-34.

USA 1982.

49. Thiele, B., Nordt, H.

THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF BRUCELLOSIS IN AFRICA.

International Symposium of Brucellosis (III)

Rabat, 1975.

30. Thornberry, G., Sherris, J.C.

LABORATORY TEST IN CHEMOTHERAPY: GENERAL CONSIDERATIONS.

Barry's Antimicrobial susceptibility testing.

Lee & Febiger, Philadelphia.

USA 1974.

31. Thornberry, C. Swanson, J.R.

SUSCEPTIBILITY TESTING OF FASTIDIUS AND UNUSUAL PATHOGENS.

The Antimicrobial News Letter Vol.4, No.6 June 1987.

USA 1987.

32. Tortora, P.J.L.

BRUCELLA OVIS.

Rev. Med. sobre Brucelosis.

+

México, 1968.

33. Trejo-Salomon, H.J.

LA DESINFECCION COMO MEDIDA CONTRAEPIDEMIOLOGICA EN EL CONTROL Y
ERADICACION DE LA BRUCELOSES.

Foro Nat. sobre Brucelosis.

México, 1968.

34. Wilson, J.B.

ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE VIRULENCIA, CAPACIDAD DE INVASION Y
DESARROLLO INTRACELULAR DE BRUCELLA ABORTUS.

Revista Latinoamericana de Microbiología Vol.5, pp 135-148

1963.

55. Wright, W.W.

FDA ACTIONS ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY DISCS.

Barry's current techniques for antibiotic susceptibility testing.

Lee & Febiger, Philadelphia.

USA 1976.