

870127
11
20j

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACION Y COMPARACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD
A LOS ANTIMICROBIANOS CUMERMICINA Y METICILINA
EN 100 CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR EL
METODO DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI).

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
BERTHA LETICIA GARCIA ALTAMIRANO

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JALISCO 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

I N D I C E

	Pag.
1.- INTRODUCCION	1
2.- GENERALIDADES	
2.1. Taxonomía	3
2.2. Antecedentes históricos	4
2.3. Características microbiológicas de <u>Staphylococcus aureus</u>	4
2.4. Patogenia	18
2.5. Aspectos generales sobre antibióticos y pruebas de susceptibilidad "in vitro"	21
2.6. Revisión de los antibióticos Meticilina y Clindamicina	30
2.7. Justificación y objetivo del trabajo	32
3.- MATERIAL Y METODO:	
3.1. Obtención de las cepas	34
3.2. Preparación de los antibióticos	34
4.- RESULTADOS	39
5.- CONCLUSIONES	56
6.- BIBLIOGRAFIA	59

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION.

Staphylococcus aureus es considerado como uno de los agentes etiológicos que más graves problemas causa en infecciones postoperatorias hospitalarias y en niños de muy corta edad.

Podemos encontrar al Staphylococcus aureus en gran cantidad y ocasionando diferentes tipos de infecciones, - sobre todo en las que se refieren a la piel, nariz, vías respiratorias, etc.

Esta problemática asociada a la multiresistencia - cada vez mayor, hace que el Staphylococcus aureus sea investigado en forma importante en cuanto a su susceptibilidad a los antimicrobianos, para que en un momento dado se elija el tratamiento adecuado para combatirlo.

En la presente investigación, se evaluará la susceptibilidad de Staphylococcus aureus a dos antimicrobianos: Meticilina y Cumermicina, y se hará una comparación para poder así determinar cuál de los dos deberá utilizarse eficazmente en el tratamiento de este tipo de infecciones.

La técnica para hacer la evaluación de dicha susceptibilidad será el método de concentración mínima inhibitoria, el cual es considerado como un método práctico y poco costoso y, que además arroja datos de tipo cuantitativo.

La finalidad de esta investigación será determinar la concentración mínima inhibitoria de 100 cepas de Staphylococcus aureus y, en base a los resultados que se obten-

gan determinar si los antibióticos utilizados (Cumermicina y Meticilina), pueden ser incluidos en el esquema para el tratamiento de infecciones causadas por Staphylococcus aureus.

CAPITULO 2 .

GENERALIDADES

2.1. TAXONOMIA. (1).

COCOS GRAM POSITIVOSANAEROBIOS FACULTATIVOS

FAMILIA I .- MICROCOCCACEAE

GENERO I .- MICROCOCCUS

GENERO II .- STAPHYLOCOCCUS

GENERO III.- PLANOCOCCUS

2.2. ANTECEDENTES HISTORICOS.

Los cocos gram positivos fueron diferenciados por primera vez por Koch en 1878, describiendo así el Staphylococcus en pus humana; además, reconoció que enfermedades diferentes eran provocadas por organismos con diferentes patrones de crecimiento, ya fueran en pares, cadenas o racimos. Pasteur, en el año de 1880 cultivaba este germen en medio líquido. Al año siguiente Ogston mostró que era patógeno para el ratón y el cobayo. Rosenbach (1884), diferenció las especies de estafilococos en base a la pigmentación de sus colonias. La especie más patógena, Staphylococcus aureus, forma colonias típicas con un pigmento amarillo dorado, mientras que colonias de Staphylococcus coagulasa negativos, forman un pigmento blanco. En 1929, Burnett encontró una hemolisina tóxica, a la cual denominó alfa-hemolisina (alfa-toxina). En 1930, Julianelle introdujo la primera clasificación de los Staphylococcus, basada en la diferencia de estructuras antigénicas, y en 1942, Fisk, desarrolló un método de tipificación por bacteriófagos. (5,6).

2.3. CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

2.3.1. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA.

Staphylococcus son células esféricas cuyo diámetro varía entre 0.7 y 1.2 micras. Son inmóviles. Al realizar la tinción de Gram para observar al microscopio, se observan células agrupadas en forma de racimos, cuando la colonia que se utilizó para hacer el frotis fue cultivada en medio sólido; esto --

aparece porque los estafilococos se dividen en tres planos sucesivos perpendiculares y las células hijas no se separan completamente; la formación de agregados irregulares se debe a los enlaces excéntricos al plano de división, así como al movimiento de las células de la posición central. En medios líquidos, al tomarse una porción y realizar la tinción de Gram, se pueden observar al microscopio, cocos en pares, tétradas y formando cadenas; esta última forma es diferente a la del género Streptococcus, ya que Staphylococcus aureus raramente forma cadenas que contienen más de cuatro miembros.

Los estafilococos jóvenes son gram positivos; sin embargo, al envejecer muchas células se vuelven gram negativas. No forma esporas. Bajo influencia de algunos agentes químicos se lisan o cambian de forma, la cual siendo una colonia siempre redondeada se vuelve lisa (forma L) o rugosa (forma R).

Las formas L tienen una pared deficiente, la cual puede ser inducida por penicilina y lisostafina y pueden ser propagadas por medios hiperosmolares. Otra forma diferente, es la forma G, la cual forma colonias pequeñas que son seleccionadas cuando el crecimiento de formas normales es inhibido por varios agentes como por ejemplo: litio, sales de bario, violeta de genciana o antimicrobianos. Las formas G, son resistentes a antibióticos y la producción de pigmento, coagulasa o hemolisinas puede estar disminuida o ausente. (2,3,5).

La pared de Staphylococcus aureus tiene dos componentes fundamentales: a) Acido teicoico unido a un aminoazúcar, y b) un peptidoglicano compuesto por n-acetil

glucosamina y N-acetil murámico ligado a subunidades peptídicas (L-alanina-L-isoglutámico-L-lisina-D-alanina), -- que a su vez está ligado con un pentapéptido de glicina.- Este puente va desde la lisina de un péptido a la D-alanina del otro. (4).

2.3.2. CRECIMIENTO Y METABOLISMO.

El crecimiento de Staphylococcus aureus es más abundante bajo condiciones de aerobiosis que en anaerobiosis; la multiplicación de algunas cepas se ve aumentada por un incremento en la tensión de CO₂. Las colonias que crecen sobre agar nutritivo, se hallan muy bien definidas y son redondas, convexas y miden de 1-4 mm de diámetro. Su clásico pigmento amarillo dorado es debido a carotenoides como: delta caroteno y sarcixantina. La producción de este pigmento resulta óptima si los microorganismos crecen a 37°C en medios enriquecidos con ácidos grasos (glicerol monofosfato o monoacetato) y hayan sido incubados de 24-48 horas. El pigmento no se produce durante anaerobiosis o cuando se utilizan medios de cultivo líquidos.

Cuando Staphylococcus aureus se cultiva sobre agar sangre, se observa frecuentemente una clara zona de hemólisis (beta-hemólisis) alrededor de las colonias. Puede producir también, cuatro diferentes hemolisinas con diferentes espectros líticos. La extensión de la hemólisis depende de la cepa y del tipo de sangre utilizada para -- elaborar el medio de cultivo. La sangre humana no se recomienda como utilizable, puesto que puede inhibir el crecimiento o alterar la aparición de las colonias.

La mayoría de las cepas de Staphylococcus aureus - crecen rápidamente en medios químicamente definidos, los cuales para dicho propósito deben contener: glucosa, sales, catorce aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico. En medios de cultivo con una base de carne digerida y enriquecida con sangre o suero, pueden tener un buen crecimiento entre amplios límites de pH (4.8-9.4). Bajo condiciones de aerobiosis producen catalasa y forman ácido a partir de glucosa, manitol, xilosa, lactosa, sacarosa y glicerol. Fermentan también el manitol y la glucosa. Algunas cepas pueden licuar la gelatina. (4,9).

Staphylococcus aureus es una bacteria muy resistente y puede permanecer durante varios meses en la superficie de las placas de agar incubadas a 4°C y se pueden cultivar a partir de muestras de pus después de varias semanas de su obtención. Algunas cepas son relativamente resistentes al calor y pueden soportar temperaturas hasta de 60°C durante 30 minutos. A pesar de ser muy sensibles a la acción bactericida de algunos colorantes básicos -- (violeta de genciana), son más resistentes que otras bacterias a desinfectantes tales como cloruro de mercurio y fenol. Staphylococcus aureus tiene también gran tolerancia a la sal y en medios que contienen de 7.5-10 % de cloruro de sodio pueden desarrollarse muy bien.

Poseen enzimas que los hacen resistentes a la acción bactericida de la grasa de la piel.

2.3.3. MEDIOS DE CULTIVO.

Staphylococcus aureus crece bien

en los cultivos ordinarios en condiciones de aerobiosis . En el medio de agar común, crece dando colonias grandes, opacas y cremosas. Se cultiva en medios que contienen --inhibidores para otras bacterias, tales como cloruro de sodio al 7.5 %. Esta propiedad es utilizada en el medio de Chapman, al cual se puede añadir gelatina para poder observar si ésta es licuada o no por esta bacteria. También se le puede añadir al medio, manitol y un indicador rojo de fenol para observar la fermentación del manitol . Otros inhibidores que no le afectan son: el telurito potásico, que es la base para el medio de Baird-Parker, o el telurito cloruro de litio (medio de Zeborit).

2.3.4. GENETICA.

En el Staphylococcus aureus, el DNA extra cromosómico tiene particular importancia en problemas clínicos de resistencia a antibióticos. En 1929, Fleming fue el primero en notar la acción bactericida de Penicillium notatum sobre las cepas de organismos que eran sensibles al antibiótico.

Hoy, aproximadamente de un 60-90% de las cepas son resistentes a la penicilina. La resistencia es causada por la penicilinasasa (beta lactamasa), la cual es una enzima de un plásmido codificado, el que divide el anillo beta lactámico del núcleo de la penicilina. Algunos plásmidos de penicilinasasa también codifican la resistencia a los metales pesados y eritromicina, y otros plásmidos que contienen a los genes que determinan la resistencia a cloramfenicol, tetraciclina, neomicina y kanamicina. (5).

A diferencia de las enterobacterias, Staphylococcus

aureus no puede conjugarse y sus plásmidos son transferidos por transducción. Tienen como característica que todas las cepas son lisogénicas, y un grupo de fagos es capaz de generalizar la transducción. La transducción de plásmidos de penicilinasa ha sido observada en diferentes especies de ratones y sobre la piel humana. Existe también una evidencia epidemiológica considerable de la aparición natural de la transducción de Staphylococcus aureus en el hombre.

Los genes de plásmidos son los responsables de la producción de una bacteriocina, la cual ha sido denominada estafilococcina; la que es una proteína térmicamente estable que inhibe el crecimiento de muchos organismos -- gram positivos.

Los plásmidos están involucrados también en la producción de otros componentes biológicamente activos, como por ejemplo: exfoliatina y enterotoxina.

El estado lisogénico influye en la susceptibilidad de la actividad lítica de otros bacteriófagos estafilococales y también en la producción de hemolisinas y enzimas (conversión lisogénica). En presencia de un ayudador de bacteriófagos y de una gran concentración de iones de calcio (Ca^{2+}), un cierto número de cepas de Staphylococcus aureus llegan a convertirse en receptores competentes para la transformación.

VARIACION GENETICA.

Entre las variaciones genéticas de Staphylococcus aureus, pueden encontrarse frecuentemente - -

aquellas que afectan a la formación de pigmento. Staphylococcus aureus puede cesar de formar pigmentos en cultivos repetidos en medios artificiales; pero la cepa puede mantener su patogenicidad, su capacidad para producir coagulasa, formar toxinas, propiedades hemolíticas, sensibilidad a bacteriófagos, resistencia a los medicamentos y la morfología de las colonias.

2.3.5. CLASIFICACION.

El método que se utiliza rutinariamente para identificar las cepas de Staphylococcus aureus es tipificación por medio de bacteriófagos. Para este propósito se ha seleccionado un grupo de bacteriófagos líticos y está dividido en cuatro grupos y uno no clasificado. Dentro de cada grupo existen fagos de diferentes tipos serológicos y morfológicos. Los serotipos 1, 2 y 3 corresponden a los fagotipos I, II y III respectivamente. En los 3 primeros fagogrupos se encuentran las cepas patógenas para el hombre; en el grupo II, las cepas extrahospitalarias y productoras de toxina exfoliativa y, en el grupo III, la mayoría de las cepas multiresistentes a los antibióticos, productoras de enterotoxina y de origen animal.

El fago receptor contenido en el complejo péptido-glicano-ácido teicoico, no es específico para ningún grupo de fagos; las diferencias de susceptibilidad en fagos, está relacionada con la inmunidad lisogénica de la cepa en prueba. Aproximadamente el 30 % de cepas no son tipificables con la prueba rutinaria de dilución a veces porque la superficie de sus componentes enmascara al sitio receptor, y en estos casos hay que utilizar suspensiones

más concentradas.

Las cepas de Staphylococcus aureus de diferentes fuentes animales tienen propiedades fisiológicas lo cual es utilizado para aislar cepas provenientes de humanos originadas en animales. Las cepas humanas pueden ser diferenciadas por reacciones de aglutinación-inhibición, pero los sistemas utilizados son complejos y no han sido modificados, y tampoco se dispone de un antisuero específico para utilizarlo directamente. Los antígenos involucrados no han sido identificados. Como el serotipo y el fagotipo son caracteres genéticos estables, se utilizan con fines epidemiológicos, sobre todo en el medio hospitalario, pues la mayoría de las infecciones y brotes epidémicos son producidos por cepas multiresistentes a los antibióticos pertenecientes a determinados serotipos o fagotipos.

2.3.6. ANTIGENOS CELULARES.

La estructura antigénica de Staphylococcus aureus es compleja y mal conocida. En la pared se han demostrado cerca de 30 antígenos y los más importantes son:

Cápsula.- Tan sólo dos de los diversos antígenos capsulares producidos por cepas mucoides de Staphylococcus aureus han podido ser caracterizados. Uno de ellos es el de la cepa "enrollada" de Willey, el cual es un polipéptido formado por lisina, alanina, ácido glutámico y glicina en proporción 1:2:1:5. El otro antígeno es el de la cepa difusa de Smith, el cual es un polímero de ácido 2-amino-2-desoxi-D-glucorónico. Este antígeno posee pro-

propiedades antifagocitarias cuando se halla en la superficie del organismo, mientras que en solución, bloquea las propiedades aglutinantes y opsonizantes de los anticuerpos anticapsulares. Se ha encontrado que la cápsula de algunas cepas está formada por péptidoglicanos (lisina, ácido glutámico o isoglutamina, glicina, alanina y glucosamina). La mayoría de las cepas que poseen cápsula, no pueden ser tipificadas por fagos y carecen de producción de coagulasa (factor de agrupamiento).

Polisacárido A.- Es específico de especie y está dado por antígenos de polisacáridos que contienen fósforo. Este polisacárido fue descubierto por Julianelle en 1935 y ha sido identificado como un ácido teicoico, el cual es un ribitol lineal con N-acetilglucosamina y ligado en la posición del carbono cuatro y D-alanina en aproximadamente 50 % de la posición del carbono dos del ribitol. El determinante antigénico es el residuo de glucosamina, el cual podría ser una cadena alfa o beta glicosídico; la mayoría de las cepas tienen ácidos teicoicos con ambas cadenas, pero algunos sólo tienen una. Los complejos de ribitol- ácido teicoico-poliglicerol, se hallan unidos en forma covalente al mucopéptido ácido murámico de la pared celular. Por lo tanto los ácidos teicoicos y antisueros con ambas especificidades son requeridos para hacer pruebas de identificación de especies y para anticuerpos.

Proteína A.- Las cepas de Staphylococcus aureus frecuentemente poseen en su superficie un componente conocido como proteína A, la cual está unida covalentemente al peptidoglicano; algunos están también liberados extracelularmente. Su peso molecular varía entre 13 000-42 000.

Puede inducir anticuerpos específicos y reaccionar con -- la porción Fab. Tiene la propiedad de unirse a la extremidad Fc de las IgG específicas. La interacción proteí--na-Fc provoca variados efectos biológicos: anafilaxis -- local y sistémica en animales, reacciones de Arthus, ac--tivación del complemento por la vía patológica clásica o alterna con generación de factores quimiotácticos, -- los cuales contribuyen al carácter piógeno de las lesio--nes estafilocócicas, inhibición de la actividad opsoni--ca de anticuerpos porque compiten con los receptores -- Fc de los fagocitos; inducción de histamina liberada de leucocitos y la proliferación de linfocitos huma--nos tipo B.

Coagulasa Combinada (Clumping Factor).- Es una -- proteína de la pared celular y se cree que reacciona con las cadenas alfa y beta de fibrinógeno y provoca cadenas_ cruzadas; también se supone que este factor es la causa -- de formación de una cubierta protectora de fibrina respon--sable de la agrupación de los estafilococos y probablemen--te de su acción inhibidora de la fagocitosis. En la ac--tualidad no se considera relacionada con la virulencia.

2.3.7. ENZIMAS EXTRACELULARES.

Las más importantes son:

Coagulasa.- Dentro de las enzimas producidas por Staphylococcus aureus en medios artificiales, la que más ha acaparado la atención es la coagulasa. Staphylococcus aureus es la única bacteria que sintetiza una coagulasa.

La coagulasa es una sustancia protéica, filtrable y

termoestable. Libre es una pre-enzima que en presencia - de protrombina y/o de un cofactor del plasma forma un complejo con actividad proteolítica, el cual transforma el - fibrinógeno en fibrina y produce la coagulación del plasma sanguíneo; a su vez, se liberan fibrinopéptidos que -- presentan una acción sobre la fibra muscular lisa. La -- coagulasa se considera estrechamente relacionada con la - virulencia, pues la mayoría de las cepas de Staphylococcus aureus la producen (48%). Interviene también en el proceso inflamatorio y la formación del coágulo intravenoso.

Fibrinolisisina (estafiloquinasa).- Transforma el - plasminógeno en plasmina o fibrinolisisina. Contribuye a - la capacidad de invasión de Staphylococcus aureus en los focos inflamatorios y es responsable de la descomposición del coágulo de fibrina y de la formación de microémbolos_ causantes de septicemia. Es elaborada por Staphylococcus aureus de origen humano.

Beta-lactamasas.- Son inducibles, sintetizadas -- por cepas resistentes que inactivan la penicilina por medio de la ruptura del anillo beta-lactámico. Se producen por un plásmido que se transmite por transducción.

Hialuronidasa.- (Factor de difusión de Duran Reynolds). Es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico por - despolimerización.

Nucleasa.- La nucleasa del Staphylococcus aureus es una fosfodestearasa con actividad endo y exo nucleasa_ que se adhiere a DNA y RNA para producir 3-fosfomononucleotidos. La enzima purificada ha sido motivo de muchos estudios y se ha encontrado que está compuesta de una ca-

dena polipeptídica simple con un peso molecular de 16,800. Se ha utilizado el ión calcio (Ca^{2+}) para una mayor actividad.

Otras enzimas.- Fosfatasa y lipasa.

2.3.8. TOXINAS.

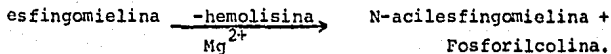
Cuando el Staphylococcus aureus se desarrolla en medios artificiales adecuados, puede producir diversas toxinas que se encuentran relacionadas con el estado de lisogenia o asociadas a la presencia de plásmidos.- Las toxinas de más importancia son:

Hemolisinas (exotoxinas).- Hasta la fecha han sido reconocidas cuatro hemolisinas de Staphylococcus aureus química y serológicamente diferentes ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$); una sola cepa que puede producir más de una hemolisina. Todas estas proteínas termolábiles producen hemólisis y una acción tóxica sobre otras células (leucocitos, macrófagos, fibroblastos). Son inmunogénicas y los anticuerpos neutralizan su actividad.

Alfa Toxina o hemolisina α .- Es la principal hemolisina de las cepas humanas de Staphylococcus aureus. Es una proteína de peso molecular de 30,000, actúa sobre los eritrocitos de conejo, lesiona a las plaquetas y es posible que sea idéntica a los factores letal y dermonecrótico de la exotoxina. También puede causar la salida de iones de liposomas artificiales. En experimentos con animales, se ha visto que causa dermonecrosis después de inyección local y es letal cuando es dada sistemáticamente. Su principal efecto son las contracciones del músculo liso. Su

modo y sitio de acción sobre la membrana celular es desconocido.

Hemolisina beta.- Es producida comúnmente por cepas animales; en cepas aisladas de humanos, solamente se produce en un 10-20%. Es una esfingomielinasa que provoca la interesante reacción frío-calor, la cual consiste en que los hematíes humanos y de carnero contenidos en cultivos en caldo o en agar sangre se lisan después de haber sido incubados a 37°C durante la noche. Su peso molecular es de 30,000 aproximadamente; es actividad por iones magnesio (Mg^{2+}); la reacción es:



La hemolisina beta es citotóxica para una cierta variedad de cultivos de tejidos celulares.

Hemolisina δ .- Es una fosfolipasa, con un peso molecular de 5,000. Es producida por cepas de Staphylococcus aureus de origen humano. Es tóxica para leucocitos, cultivos de células de tejidos y protoplastos bacterianos. La actividad de esta hemolisina puede ser bloqueada por fosfolípidos que se encuentran en el suero normal. La toxicidad para animales es relativamente mínima.

Hemolisina γ .- Posee menor potencia que las demás hemolisinas. Aún no ha sido bien caracterizada y se cree que está formada por dos proteínas básicas. Los cultivos que contienen eritrocitos humanos, de conejo y carnero son susceptibles a la actividad de esta hemolisina.- Puede ser inhibida en medios que contengan sulfato. Tam-

bién es inhibida por el colesterol y muchos otros lípidos.

Leucocidina.- Descubierta por Pantón y Valentine. Es producida por muchas cepas de Staphylococcus aureus. - Está compuesta por dos proteínas electroforéticamente distintas: F (fast, rápida) y S (slow, lenta). Los dos componentes son antigénicos y pueden ser neutralizados por anticuerpos. Actúan en combinación con iones de Ca^{2+} , lo cual provoca la degranulación de leucocitos polimorfonucleares de humanos y conejos.

Exfoliatina (toxina epidermolítica).- Causa una gran variedad de lesiones dermatológicas. Tiene un peso molecular de 24,000, y es una proteína termoestable y scidolábil. Es producida por aproximadamente un 5 % de las cepas de Staphylococcus aureus, principalmente por cepas del grupo II. La toxina actúa por adhesión al estrato -- granuloso de la epidermis, probablemente por desmosomas, los cuales encadenan a las células a este estrato. Provoca enrojecimiento de la piel y lesiones bulosas seguidas de una exfoliación más o menos intensa.

Enterotoxina.- Son exotoxinas proteicas que tienen la propiedad de resistencia térmica y a los fermentos proteolíticos (jugo digestivo). Tienen un peso molecular de 35,000. Provoca la mayoría de las toxoinfecciones alimentarias. Se fijan en los receptores nerviosos del tubo digestivo produciendo náuseas, diarrea y vómitos por acción de la toxina en el centro del vómito.

Son toxinas antigénicas y se transforman en anatoxinas. Se conocen 6 enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, D y E), que son identificables por inmunodifusión. La A, B y D -

son las más importantes. En su mayoría son producidas -- por fagos de los grupos III y IV. Las enterotoxinas A y D producen la mayoría de los cuadros de intoxicación alimentaria y la B parece estar asociada con cuadros de enterocolitis.

2.4. PATOGENIA.

La piel y narinas de infantes son coloniza das por Staphylococcus aureus a los pocos días de nacidos. Los organismos son encontrados comúnmente en las narinas_ anteriores, sobre la piel y membranas mucosas; el epite--lio nasal de los portadores puede tener especial afinidad para él.

La supuración es la característica de la enferme--dad estafilocócica y la lesión más frecuente es el absco_ so cutáneo o forúnculo, el cual inicia como una infección de glándulas sebáceas o la infección del poro de un vello. Al desarrollarse el absceso, se puede observar en su cen--tro pus, la cual contiene a la bacteria muerta, fagocitos y fluidos, rodeados por una pared de fibrina, células in--flamatorias y bacterias vivas. A veces, pueden aparecer_ abscesos en serie conectados entre sí. (3)

Los factores predisponentes para adquirir infeccio_ nes por Staphylococcus aureus y aumentar la patogenici--dad, son variados y serán descritos más adelante.

Mecanismos especiales de patogenicidad operan en - las enfermedades estafilocócicas del tracto gastrointes--tinal. El consumo de alimentos contaminados por Staphylo--coccus aureus que ha elaborado la enterotoxina, en espe--

cial productos que contienen crema pastelera, pueden producir gastroenteritis, la cual se caracteriza por tener - un corto período de incubación (1-6 horas), ausencia de - fiebre y predominio de vómito y diarrea. (9).

También pueden ocasionar enterocolitis en personas que han tenido un tratamiento intenso con antibióticos de amplio espectro (por ejemplo tetraciclina), puesto que es te tratamiento ocasiona la destrucción de la flora normal del tubo digestivo y la proliferación de Staphylococcus aureus.

2.4.1. TIPOS DE INFECCIONES QUE CAUSAN STAPHYLOCOCCUS AU-REUS.

Se pueden clasificar en tres grandes grupos.

1.- Infecciones localizadas.

a) Infecciones cutáneas y subcutáneas.

- Foliculitis de la piel
- Síndrome de Liell o piel escaldada
- Impétigo

b) Infecciones oftálmicas.

- Conjuntivitis
- Blefaritis

c) Infecciones orales y del árbol respiratorio

- Rinitis
- Faringitis
- Otitis
- Mastoiditis
- Bronquitis

d) Infecciones urogenitales

- Abscesos en riñón, prostatitis
- Flemón perinefrítico, pielonefritis

2.- Infecciones generalizadas.

La septicemia es la principal en este tipo de infecciones. Es ocasionada por la formación de un coágulo intravenoso, a partir del cual Staphylococcus aureus - se multiplica e invade la sangre.

Pueden presentarse formas hiperagudas (tromboflebitis) que puede ocasionar la muerte y formas subagudas - (septicopiemias), y aún crónicas.

3.- Infecciones alimentarias.

Se manifiestan por medio de diarrea y vómito , después de un corto período de incubación (1-6 horas).

2.4.2. INFECCIONES HOSPITALARIAS.

Se presentan con gran -- frecuencia y es uno de los más graves problemas a los cuales se enfrenta un hospital. Esta gran frecuencia es debida a numerosas fuentes de transmisión (enfermos con lesiones abiertas y portadores sanos), a la facilidad en la transmisión (manos, ropa de cama, gotas de flush, etc.), y a que la población hospitalaria es más susceptible a infecciones (enfermedades graves o el tipo de tratamiento - a que están sometidos como por ejemplo: intervenciones -- quirúrgicas, inyecciones, catéteres, etc.).

2.5. ASPECTOS GENERALES SOBRE ANTIBIOTICOS.

Es una de las principales armas de las cuales se disponen para la lucha contra los microorganismos patógenos.

2.5.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

A fines del siglo pasado, Pasteur y Joubert fueron los primeros en observar el fenómeno de antibiosis. En este siglo, el éxito obtenido con el uso de antisépticos hizo que proliferara la investigación acerca de sustancias antimicrobianas que no fueran tóxicas para el organismo humano. En 1955, Dogmak descubre el Prontosil, al estar estudiando los colorantes, el cual tiene un núcleo activo que es p-aminobencenosulfonamida, el que al sustituirse con diversos radicales ha dado origen a un gran número de compuestos, que hoy se conocen como sulfamidas.

En 1928, Fleming observó la inhibición del crecimiento de un estafilococo patógeno por un hongo (Penicillium notatum). Esto dio origen a que un grupo de investigadores aislara el primer antibiótico conocido como la penicilina.

Después de este descubrimiento, se desató una serie de investigaciones lo cual dio lugar a que en 1939, Dubos descubriera la tirotricina; Waksman descubre la estreptomycin en 1943 y la terramicina en 1950.

En la actualidad se conocen aproximadamente unos cien antibióticos de utilidad clínica. (19)

2.5.2. DEFINICION DE ANTIBIOTICO.

Anteriormente se utilizó el término antibiótico para definir a las sustancias orgánicas producidas por microorganismos que eran capaces de inhibir o destruir a otros microorganismos.

En 1941, Waksman propone que las sustancias que se consideren como antibióticos deben cumplir las siguientes condiciones:

1.- Especificidad.- El antibiótico debe actuar en un sitio concreto de la bacteria. En general se le considera a esta especificidad como el espectro de acción.

2.- Potencia biológica elevada.- Debe ser activo a pequeñas concentraciones, lo cual se expresa actualmente como la concentración mínima inhibitoria, es decir, la concentración más baja en mcg/ml, que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

3.- Toxicidad selectiva.- Que el antibiótico destruya los microorganismos patógenos y que a su vez, la toxicidad para las células del organismo sea mínima.

2.5.3. CLASIFICACION.

I.- Por su origen:

- a) Biológicos.- Producidos por microorganismos.
 - Bacterias típicas (polimixinas)
 - Actinomicetos (cloramfenicol)
 - Hongos (penicilina)

b).- Sintéticos.- Producidos por síntesis química.

c).- Semisintéticos.- A partir del núcleo básico del antibiótico producido por microorganismos, se enlaza en la posición adecuada, radicales obtenidos por sintesis. Constituyen el grupo más numeroso e importante.

II.-Por el espectro de acción:

- a) Amplio espectro
- b) Espectro intermedio
- c) Espectro corto

III.-Por su forma de actuación:

a) Bacteriostáticos.- Bloquean el desarrollo y multiplicación de las bacterias.

b) Bactericidas.- Provocan la muerte de las bacterias.

IV.- Por su mecanismo de acción:

Se define como la forma en que actúan a nivel molecular en el microorganismo (inhibición de la formación de pared celular, inhibición de síntesis de proteínas, etc.).

V.- Por su estructura química:

Esta clasificación origina familias y grupos de antibióticos y es la más utilizada para adecuar parámetros clínico-microbiológicos.

FAMILIAS Y GRUPOS MAS IMPORTANTES.

I.- Beta lactaminas (penicilinas, cefalosporinas,-

etc.)

- II.- Amiciclitos (espectinomicina, aminoglicósidos)
- III.- Polipeptídicos
- IV.- Tetraciclinas
- V.- Cloramfenicol y derivados
- VI.- Macrólidos
- VII.- Lincosamidas
- VIII.- Rifamicinas
- IX.- Fosfomicina
- X.- Sulfamidas

2.5.4. MECANISMOS DE ACCION.

Para que un antibiótico ejerza su acción, debe cumplir los siguientes requisitos:

- 1.- Llegar al foco de infección.
- 2.- Penetrar en las bacterias y alcanzar la concentración necesaria; esta penetración puede ser por difusión o transporte activo.
- 3.- Debe tener una acción bactericida más que bacteriostática.
- 4.- Ejercer su actividad en presencia de líquidos del organismo o exudados.
- 5.- No perturbar las defensas del organismo ni dañar tejidos celulares.

En el aspecto molecular, los antibióticos pueden -

ejercer su acción en las siguientes estructuras o funciones bacterianas:

- Inhibición de la pared celular.

La pared celular actúa en los microorganismos como un protector anatomofisiológico. Las bacterias tienen una gran presión osmótica interna, sobre todo las gram positivas (aproximadamente 20 atmósferas) y, sin la pared celular se destruirían por un estallido en un medio normal, no hiperosmótico. Las penicilinas y cefalosporinas inhiben la síntesis de la pared celular interfiriendo en la incorporación de la D-alanil-D-alanina. Son análogos estructuralmente y por ello se unen a las transpeptidasa (mucopéptido NaG-NaM-pentapéptido) y las activan irreversiblemente.

- Alteración de la membrana celular.

La membrana celular actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, controlando así, la composición del medio interno celular.

Hay antibióticos como las polimixinas y los polienos que modifican la permeabilidad de la membrana permitiendo la salida de iones potasio y ácidos nucleicos, causando un efecto lítico.

- Inhibición de la síntesis proteica.

La síntesis proteica se realiza por la intervención de los diversos tipos de ácido ribonucleico. Los aminoglicósidos inhiben la síntesis proteica; su forma de acción es la siguiente: se unen de forma irreversible con

un receptor proteico de los ribosomas. Esto ocasiona un bloqueo de la actividad normal del complejo de iniciación y distorsiona el codon del lugar A, provocando la incorporación del ARN_t a un aminoácido diferente al codificado.

- Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos.

Se basa en la competencia que tienen ciertos antibióticos con algunas bases púricas y pirimidínicas, - - puesto que éstos son análogos estructuralmente.

2.5.5. RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS.

Este es uno de los problemas más graves que pueden presentarse, y los médicos y microbiólogos para poder combatir con eficacia una patología de esta naturaleza deben tener en cuenta que muchos microorganismos han desarrollado resistencia aún a - antibióticos de reciente introducción a la terapéutica.

Una cepa bacteriana considerada como resistente a un antibiótico o a un quimioterápico, es aquella que necesita para su inhibición concentraciones de fármacos superiores a la concentración que puede alcanzar en el sitio de infección.

Existen dos tipos de variación genética microbiana; una de ellas es la variación fenotípica que afecta a la población bacteriana, la cual no es hereditaria y es inducida por agentes extrínsecos. La resistencia de las bacterias a los antibióticos no pertenece a este tipo de variación. Esta es debida a una modificación en la estructura genética de las bacterias. En las bacterias, el

cromosoma puede estar sujeto a una modificación espontánea, rara y hereditaria en la secuencia de sus bases. -- Existen también en las bacterias elementos extracromosómicos portadores de información (episomas, plásmidos) los cuales pueden ser transferidos de una bacteria a otra. - Este fenómeno es muy importante puesto que es el más observado en las cepas aisladas clínicamente.

Resistencia cromosómica.- Existen poblaciones microbianas sensibles ($10^6 - 10^{10}$) que pueden contener microorganismos resistentes, pero esta frecuencia es relativamente baja. La tasa de mutación es considerada como la aparición de un mutante por bacteria y por ciclo de división. Este fenómeno ocurre como cualquier tipo de mutación, con las características de transmisión hereditaria y estabilidad, sin excluir la mutación invertida. Este fenómeno es independiente del antibiótico.

La resistencia puede transmitirse de una bacteria a otra por cualquiera de los tres tipos de transferencia, los cuales son: Transformación por el DNA extraído de una bacteria, transducción por un bacteriófago, y conjugación por el factor sexual F.

Esta mutación modifica la concentración mínima inhibitoria; no todos los mutantes serán capaces de crecer en cualquier concentración de antibiótico. Existe un nivel de resistencia que se expresa por la concentración mínima inhibitoria del mutante resistente y por la relación entre la concentración mínima inhibitoria del mutante y de la cepa original. (5).

Resistencia extracromosómica.- En investigaciones

realizadas desde 1960, se ha encontrado que la información necesaria no está contenida en el cromosoma sino en elementos extracromosómicos que también están constituidos por DNA, los cuales pueden transmitirse por una bacteria resistente a una sensible por diversos mecanismos.

En los estafilococos la producción de la enzima destructora de la penicilina G (penicilinas) es debida a elementos extracromosómicos; esta resistencia puede desaparecer espontáneamente.

Resistencia de los estafilococos.- Estos producen beta-lactamasas capaces de cortar la unión beta-lactamasas y de transformar el núcleo de la penicilina en ácido peniciloico; la información genética responsable de la producción de la penicilinas está situada en un elemento extracromosómico, el cual contiene diversas informaciones. La bencilpenicilina y la ampicilina son fácilmente destruidas por la beta-lactamasas de los estafilococos. La mayoría de los estafilococos producen penicilinas en cantidad suficiente como para ser clínicamente resistentes. Se ha observado que la concentración mínima inhibitoria de las bacterias productoras de esta enzima depende del tamaño del inóculo, ya que inóculos débiles pueden parecer sensibles, e inóculos fuertes, resistentes.

2.5.6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA POR LA TECNICA DE DILUCION.

Técnica de dilución.

Desde 1944, después de una serie de estudios realizados, se sabe que la actividad bioquímica de los antibió

ticos es la misma "in vivo" e "in vitro".

Cada antibiótico tiene un objetivo molecular preciso, es decir, que éste afecta una reacción precisa del metabolismo bacteriano, siempre y cuando se encuentre en una concentración adecuada. Los efectos bacteriostáticos permiten definir la concentración suficiente o concentración mínima inhibitoria (CMI). La determinación e interpretación de CMI nos permite conocer la sensibilidad de las bacterias aisladas clínicamente.

En una serie de tubos con medio de cultivo sembrados con el mismo número de bacterias y concentraciones diferentes de antibiótico, se puede apreciar después de un cierto tiempo de cultivo, el crecimiento de bacterias en un cierto número de tubos, los cuales tienen un crecimiento idéntico al del tubo testigo; en estos tubos la concentración del antibiótico aparentemente no ha afectado a las bacterias.

En otros tubos con concentraciones superiores se podrán observar disminuciones en el crecimiento. En función del tiempo esta disminución afecta principalmente a la fase de crecimiento exponencial, que es más lenta a medida que aumenta la concentración de antibiótico.

Por lo tanto, la concentración mínima inhibitoria será la más baja concentración que inhibe el crecimiento visible. Esta concentración es expresada en mcg/ml y varía según el tiempo de observación, número y estado de las bacterias y el método de cultivo. Estas variaciones se conocen como modalidades de acción de antibióticos.

Tiempo de observación.- La concentración mínima -inhibitoria evoluciona sensiblemente durante la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, al alcanzar la fase estacionaria, es menor su evolución. Las condiciones más favorables para esta técnica es la de incubar durante la noche (16-24 horas).

Bacterias.- La concentración mínima inhibitoria -varía según el número de bacterias sembradas (inóculo). - La concentración mínima inhibitoria es más elevada para - una población de 10^7 bacterias por mililitro.

El inóculo utilizado debe provenir de varias colonias; esto reduce la probabilidad de variantes selectivas derivadas de mutantes (por ejemplo, pérdida de producción de penicilinas en Staphylococcus) e incrementa la posibilidad de incluir organismos más resistentes que no pueden distinguirse en las colonias ya que son morfológicamente parecidas.

El inóculo final incrementa la posibilidad de detectar mutaciones de alta frecuencia para cepas resistentes y heteroresistentes.

2.6. REVISIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS METICILINA Y CUMERMICINA

2.6.1. METICILINA

Características:

Apariencia - Polvo fino

Color - Blanco

Potencia microbiológica - 670 mcg/ml en una -
concentración de --
200 mcg/ml.

2.6.2. CUMERMICINA

Cumermicina A (Coumermycin A₁)

Es una sal monosódica. Lote No. BPR+D006014.

Apariencia - Polvo fino

Color - Ligeramente amarillo

pH de solución al 1% - 6.9

Pureza - 953 mcg de ácido libre por mg de base anhidra

Cumermicina A₁ - 82.5 %

Cumermicina B - 0.2 %

Cumermicina C - 2.8 % Actividad microbiológica

Cumermicina D - 9.8 % gica similar

95.3 % base seca

Fórmula molecular (C₅₅H₅₉O₂₀N₅) - 1110.89

(ácido libre)

Peso molecular de la sal monosódica - 934

mcg/ml.

Factor de potencia - 1.07

Solución de Cumermicina (Ro-5-4645)

Este antibiótico fue obtenido de Laboratorios Roche y la apariencia del antibiótico es la de un polvo cristalino de color amarillento.

Los siguientes datos se refieren a la actividad de Cumermicina sobre Staphylococcus aureus comparada con - - otros antibióticos. (17)

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO-SUSCEPTIBLES.

ANTIBIOTICO	CMI (mcg/ml)		
	RANGO	50%	90%
Cumermicina	0.0031-0.2	0.0031	0.25

Meticilina	0.8-12.5	3.1	12.5
Nafcilina	0.1-3.1	0.8	1.6
Vancomicina	0.1-6.3	1.6	3.1
Teicomicina	0.1-6.3	1.6	3.1
Eritromicina	0.2-100	1.6	1.6
Rifampicina	0.0031-0.1	0.0031	0.063

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO-RESISTENTES

ANTIBIOTICO	CMI (mcg/ml)		
	RANGO	50%	90%
Cumermicina	0.0016-0.8	0.0125	0.05
Meticilina	25-100	25	100
Nafcilina	25-100	50	100
Vancomicina	0.2-6.3	1.6	3.1
Teicomicina	0.2-6.3	0.8	1.6
Rifampicina	0.0016-12.5	0.0125	0.05
Gentamicina	0.1-25	3.1	25

2.7. JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL TRABAJO.

a) Cumermicina.- En estudios realizados por el Departamento de Medicina y Farmacología de la Universidad de Columbia en relación con este antibiótico, se ha visto que puede inhibir el crecimiento de cepas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis, los cuales son resistentes a otros antibióticos.

La cumermicina es una bis-hidroxi-cumarina compuesta, la cual tiene una excelente actividad in vitro contra especies gram positivas. Tiene una DNA girasa inhibidor. (17).

b) Meticilina.- Fue la primera penicilina semisintética y fue introducida al uso clínico por primera vez - en Inglaterra en 1959 para combatir infecciones ocasionadas por Staphylococcus aureus. Dos años después, se observó la aparición de cepas de Staphylococcus aureus resistentes al tratamiento con meticilina en varios países del mundo.

Desde entonces, Staphylococcus aureus ha sido clasificado en meticilino-resistentes y meticilino-sensibles, de acuerdo al efecto que provoca la meticilina en ellos.

Los Staphylococcus aureus meticilino resistentes - son los principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias. (14)

Por lo anteriormente descrito, es importante realizar investigaciones en forma constante para poder detectar dicha resistencia y además, probar nuevos antibióticos para poder establecer un tratamiento adecuado y eficaz contra infecciones causadas por Staphylococcus aureus.

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

3.1. OBTENCION DE LAS CEPAS.

Las cepas de Staphylococcus aureus con las que se realizó el presente estudio, fueron proporcionadas por la Sección de Microbiología del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Angel Leaño.

El número de cepas de Staphylococcus aureus utilizadas fue de cien. Dichas cepas fueron obtenidas a partir de diferentes muestras biológicas y se realizaron las pruebas correspondientes para la confirmación de especie aureus, mediante el siguiente proceso.

a) Reaislamiento.- Se realizó en medio de agar -- sangre de carnero a 37°C, en atmósfera de CO₂, durante 24 horas, después de lo cual se observaron los caracteres -- morfológicos coloniales.

b) Examen microscópico.- Comprendió la observación de un frotis de la colonia en estudio, a la cual se le hizo tinción de Gram.

c) Pruebas bioquímicas características de especie.

- Producción de coagulasa.
- Hidrólisis del DNA.

3.2. PREPARACION DE LOS ANTIBIOTICOS.

La preparación de los antibióticos se llevó a cabo de la siguiente manera : se disolvieron 0.1049 mgr de Cumermicina en 1 ml. de Dimetil Sulfóxido (DMSO) para solubilizarla; luego es llevada

a un volumen de agua estéril (100 ml.). Después las diluciones seriadas del stock de cumermicina serían hechas en caldo de Müller-Hinton (MBH).

Este antibiótico en presencia de suero se vuelve alcalino, por la actividad biológica y es más bajo que en la presencia de suero mantenido a pH 7.2-7.4.

La cumermicina puede ser preparada y almacenada durante algún tiempo, puesto que es estable a un rango de -20°C a -8°C, durante unas 4 a 8 semanas.

Preparación de la Meticilina.- Se pesaron 0.298 mg para elaborar una solución de 100 ml de antibiótico de metilina. Este polvo de antibiótico utiliza como solvente y diluyente, agua.

La siguiente fórmula es utilizada para determinar la cantidad de polvo de antibiótico que debe utilizarse para alcanzar la concentración de antibiótico requerida:

$$\text{Peso(mg)} = \frac{\text{volumen (ml)} \times \text{concentración (mcg/ml)}}{\text{Potencia(mcg/ml)}} \quad (13)$$

Este método se llevó a cabo utilizando la técnica de dilución del antibiótico en medio líquido de Müller-Hinton.

a) Preparación del medio líquido.

Se realizó siguiendo las instrucciones de la etiqueta del medio líquido de Müller-Hinton (MHB, siglas en inglés de Müller-Hinton Broth). Disolver 22 gr. del medio para preparar 1,000 ml. de cultivo líquido.

1.- Se preparó medio líquido de MHB a doble concentración (0.044 gr/ml).

2.- Se preparó medio líquido de Müller-Hinton de concentración normal (0.022 gr/ml).

b) Preparación del medio líquido conteniendo antibiótico.

Desarrollo del sistema para la evaluación de la -- CMI.

Se preparó una serie de 10 tubos estériles (13X100) los cuales se numeraron, conteniendo las siguientes cantidades de MHB; en el tubo número 1 se colocaron 2 ml de -- caldo de Müller-Hinton de doble concentración y los tubos del número dos al número diez contenían 1 ml. de MHB de concentración normal.

Al tubo No. 1 de doble concentración se le añadió 1 ml. de antibiótico y se agitó en el vortex, después se tomó un ml. del mismo tubo No. 1 (utilizando pipetas de 1 ml) y se pasó al tubo No. 2; se agitó en el vortex y se pasó 1 ml. al tubo No. 3; esto se realizó sucesivamente hasta terminar con el tubo número 10, donde al final se desechó 1 ml.

Este procedimiento se realizó en igual forma para los dos antibióticos.

Las concentraciones en cada tubo fueron:

1.- Para cumermicina

Tubo No.	Concentración (mcg/ml)
1	1
2	0.5
3	0.25
4	0.125
5	0.0625
6	0.03125
7	0.015625
8	0.0078125
9	0.0039062
10	0.0019531

2.- Para metecilina

Tubo No.	Concentración (mcg/ml)
1	100
2	50
3	25
4	12.5
5	6.25
6	3.125
7	1.5625
8	0.78125
9	0.39062
10	0.19531

c) Preparación del inóculo.

Se tomaron con el asa 3 ó 4 colonias de un solo tipo y se colocaron en tubos conteniendo 10 ml. de caldo de tripticasa-soya. Se observó la turbidez y se ajustó la densidad óptica de la suspensión bacteriana a una turbidez equivalente a 0.5 del estándar de la escala de McFarland. Este tubo contiene aproximadamente 10^7 células/ml. (4)

d) Inoculación de los tubos que contienen la dilución del antibiótico.

A cada uno de los tubos que contienen antibiótico diluido, se le agregaron 0.5 ml del inóculo y se agitaron.

e) Incubación y lectura final.

Los tubos inoculados fueron incubados a 35°C por 24 horas, iniciando su incubación por la noche.

La concentración mínima inhibitoria comprendió a la concentración más baja de antibiótico que inhibió completamente el crecimiento de Staphylococcus aureus. Esta concentración mínima inhibitoria se determinó visualmente. (4)

CAPITULO 4

RESULTADOS

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos después de haber -
 utilizado el método de concentración mínima inhibitoria -
 (CMI) para probar la susceptibilidad de Staphylococcus --
aureus a cumermicina y meticilina se muestran en la tabla
 No. 1.

TABLA No. 1

Cepa No.	CMI mcg/ml Cumermicina	CMI mcg/ml Meticilina
1	0.015625	3.125
2	0.0625	6.25
3	0.03125	6.25
4	0.03125	6.25
5	0.015625	3.125
6	0.0625	3.125
7	0.0625	1.5625
8	0.0625	6.25
9	0.0625	3.125
10	0.03125	6.25
11	0.03125	6.25
12	0.015625	3.125
13	0.0625	3.125
14	0.015625	3.125
15	0.015625	6.25
16	0.03125	3.125
17	0.03125	6.25
18	0.03125	6.25
19	0.125	6.25
20	0.015625	6.25
21	0.015625	6.25

22	0.015625	3.125
23	0.0625	6.25
24	0.03125	3.125
25	0.03125	6.25
26	0.015625	6.25
27	0.03125	6.25
28	0.0625	6.25
29	0.03125	6.25
30	0.03125	6.25
31	0.0625	6.25
32	0.03125	12.5
33	0.0625	6.25
34	0.03125	6.25
35	0.0625	3.125
36	0.0625	6.25
37	0.015625	3.125
38	0.03125	6.25
39	0.03125	3.125
40	0.03125	3.125
41	0.0625	1.563
42	0.03125	3.125
43	0.0625	3.125
44	0.03125	6.25
45	0.0625	3.125
46	9.0625	3.125
47	0.03125	6.25
48	0.0625	3.125
49	0.03125	1.5625
50	0.0625	1.5625
51	0.25	6.25
52	0.125	6.25
53	0.015625	50
54	1.0	6.25

55	0.125	3.125
56	0.125	6.25
57	0.25	3.125
58	0.015625	6.25
59	0.125	25
60	0.125	25
61	0.015625	1.5625
61	0.125	6.25
63	0.0625	3.125
64	1.0	6.25
65	0.25	1.5625
66	0.125	6.25
67	1.0	3.125
68	0.125	1.5625
69	0.125	3.125
70	0.125	3.125
71	1.0	6.25
72	0.125	6.25
73	0.0625	1.5625
74	0.0625	1.5625
75	0.125	1.5625
76	0.03125	3.125
77	0.125	0.7815
78	0.125	1.5625
79	0.03125	0.7815
80	0.03125	6.25
81	0.03125	0.7815
82	1.0	3.125
83	0.125	3.125
84	0.5	3.125
85	0.0625	6.25
86	0.0625	3.125
87	0.0625	3.125

88	0.0625	6.25
89	0.03125	1.5625
90	0.0625	3.125
91	0.25	6.25
92	0.125	3.125
93	0.125	6.25
94	0.25	12.5
95	0.125	3.125
96	0.25	3.125
97	0.0625	3.125
98	0.0625	1.5625
99	0.0625	1.5625
100	0.0625	3.125

CMI = Concentración mínima inhibitoria.

TABLA No. 2
DATOS ORDENADOS

Número	CMI (mcg/ml) CUMERMICINA	CMI (mcg/ml) METICILINA	C	M
1	0.015625	0.07815	1	77
2	0.015625	0.07815	5	79
3	0.015625	0.07815	12	81
4	0.015625	1.5625	14	7
5	0.015625	1.5625	15	41
6	0.015625	1.5625	20	49
7	0.015625	1.5625	21	50
8	0.015625	1.5625	22	61
9	0.015625	1.5625	26	65
10	0.015625	1.5625	37	68
11	0.015625	1.5625	53	73
12	0.015625	1.5625	58	74
13	0.015625	1.5625	61	75
14	0.03125	1.5625	4	78
15	0.03125	1.5625	10	89
16	0.03125	1.5625	11	98
17	0.03125	1.5625	16	99
18	0.03125	3.125	17	1
19	0.03125	3.125	18	5
20	0.03125	3.125	24	6
21	0.03125	3.125	25	9
22	0.03125	3.125	27	12
23	0.03125	3.125	29	13
24	0.03125	3.125	30	14
25	0.03125	3.125	32	16
26	0.03125	3.125	34	22
27	0.03125	3.125	3	24
28	0.03125	3.125	38	35

29	0.03125	3.125	39	37
30	0.03125	3.125	40	39
31	0.03125	3.125	42	40
32	0.03125	3.125	44	42
33	0.03125	3.125	47	43
34	0.03125	3.125	49	45
35	0.03125	3.125	76	46
36	0.03125	3.125	79	48
37	0.03125	3.125	80	55
38	0.03125	3.125	81	57
39	0.03125	3.125	89	63
40	0.0625	3.125	2	67
41	0.0625	3.125	6	69
42	0.0625	3.125	7	70
43	0.0625	3.125	8	76
44	0.0625	3.125	9	82
45	0.0625	3.125	13	83
46	0.0625	3.125	23	84
47	0.0625	3.125	28	86
48	0.0625	3.125	31	87
49	0.0625	3.125	33	90
50	0.0625	3.125	35	92
51	0.0625	3.125	36	95
52	0.0625	3.125	41	96
53	0.0625	3.125	43	97
54	0.0625	3.125	45	100
55	0.0625	6.25	46	2
56	0.0625	6.25	48	3
57	0.0625	6.25	50	4
58	0.0625	6.25	63	8
59	0.0625	6.25	73	10
60	0.0625	6.25	74	11
61	0.0625	6.25	85	15

62	0.0625	6.25	86	17
63	0.0625	6.25	87	18
64	0.0625	6.25	88	19
65	0.0625	6.25	90	20
66	0.0625	6.25	97	21
67	0.0625	6.25	98	23
68	0.0625	6.25	99	25
69	0.0625	6.25	100	26
70	0.125	6.25	19	27
71	0.125	6.25	52	28
72	0.125	6.25	55	29
73	0.125	6.25	56	30
74	0.125	6.25	59	31
75	0.125	6.25	60	33
76	0.125	6.25	62	34
77	0.225	6.25	66	36
78	0.125	6.25	68	38
79	0.125	6.25	69	44
80	0.125	6.25	70	47
81	0.125	6.25	72	51
82	0.125	6.25	75	52
83	0.125	6.25	77	54
84	0.125	6.25	78	56
85	0.125	6.25	92	58
86	0.125	6.25	93	62
87	0.125	6.25	83	64
88	0.125	6.25	95	71
89	0.25	6.25	51	66
90	0.25	6.25	57	72
91	0.25	6.25	65	80
92	0.25	6.25	91	85
93	0.25	6.25	94	91
94	0.25	6.25	96	93

95	0.5	6.25	84	88
96	1	12.5	64	32
97	1	12.5	67	94
98	1	25.0	71	59
99	1	25.0	82	60
100	1	50.0	54	53

CMI = Concentración Mínima inhibitoria

C = Comermicina

M = Meticilina.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA 50 %
PARA CUMERMICINA.

$$\text{CMI } 50 \% = \frac{\text{Dato ordenado No. 49} + \text{Dato ordenado No.50}}{2}$$

$$\text{CMI } 50 \% = \frac{0.0625 + 0.0625}{2} = 0.0625 \text{ mcg/ml}$$

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA 50 %
PARA METICILINA.

$$\text{CMI } 50 \% = \frac{3.125 + 3.125}{2} = 3.125 \text{ mcg/ml.}$$

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA 90 %.

Esta es otra determinación, para observar la concentración mínima inhibitoria que requieren el 90% de las cepas para ser inhibidas. Este dato se obtiene de la misma forma que la CMI 50 %.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA 90 % PARA CUMERMICINA.

$$\text{CMI } 90 \% = \frac{0.25 + 0.25}{2} = 0.0125 \text{ mcg/ml}$$

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA 90 % PARA METICILINA.

$$\text{CMI } 90 \% = \frac{6.25 + 6.25}{2} = 6.25 \text{ mcg/ml}$$

De la tabla No. 2 obtenemos el valor promedio de cada una de las concentraciones en cada una de las cepas, y el valor promedio muestral de esta investigación, así como el error típico asociado a cada concentración.

TABLA 2.1

$\bar{X}_1 = 0.95$	$\sigma_1(n-1) = 0.2190429$
$\bar{X}_2 = 0.95$	$\sigma_2(n-1) = 0.2190429$
$\bar{X}_3 = 0.94$	$\sigma_3(n-1) = 0.2386832$
$\bar{X}_4 = 0.88$	$\sigma_4(n-1) = 0.3265986$
$\bar{X}_5 = 0.69$	$\sigma_5(n-1) = 0.4648232$
$\bar{X}_6 = 0.39$	$\sigma_6(n-1) = 0.4902071$
$\bar{X}_7 = 0.13$	$\sigma_7(n-1) = 0.337996$
$\bar{X}_8 = 0.00$	$\sigma_8(n-1) = 0.00$
$\bar{X}_9 = 0.00$	$\sigma_9(n-1) = 0.00$
$\bar{X}_{10} = 0.00$	$\sigma_{10}(n-1) = 0.00$
$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{10} \bar{X}_i}{10} = 0.493$	$S_1 = 0.4317419$

TABLA 2.2

$\bar{Y}_1 = 1.00$	$\alpha_1(n-1) = 0.00$
$\bar{Y}_2 = 1.00$	$\alpha_2(n-1) = 0.00$
$\bar{Y}_3 = 0.99$	$\alpha_3(n-1) = 0.1$
$\bar{Y}_4 = 0.97$	$\alpha_4(n-1) = 0.1714466$
$\bar{Y}_5 = 0.95$	$\alpha_5(n-1) = 0.2190429$

$$\bar{y}_6 = 0.54$$

$$\bar{y}_7 = 0.17$$

$$\bar{y}_8 = 0.03$$

$$\bar{y}_9 = 0.00$$

$$\bar{y}_{10} = 0.00$$

$$\alpha_6(n-1) = 0.5009082$$

$$\alpha_7(n-1) = 0.3775251$$

$$\alpha_8(n-1) = 0.1714466$$

$$\alpha_9(n-1) = 0.00$$

$$\alpha_{10}(n-1) = 0.00$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{10} \bar{y}_i}{10} = 0.565$$

$$s_2 = 0.4657908$$

Debido a que el tamaño de la muestra es significativamente grande ($n=100$) para cada una de las concentraciones podemos usar s_1 y s_2 .

Las variaciones muestrales como estimadores insesgados de las variaciones poblacionales y así usar el de - prueba estadística:

$$z = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Para hacer una prueba de hipótesis para la diferencia de las 2 medias teniendo como hipótesis nula

$$H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$$

e hipótesis alternativa

$$H_a = \mu_1 - \mu_2 < 0$$

Con un nivel de significancia $\alpha = 0.0005$ que proporciona el valor crítico $z = -3.291$ por lo que se rechazará H_0 si $z < -3.29$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

$$\text{Como } z = \frac{0.493 - 0.565}{\sqrt{\frac{(0.432)^2}{1000} + \frac{(0.466)^2}{1000}}}$$

$$z = -3.583 < -3.291$$

Por lo cual se rechaza H_0 en favor de H_a y de acuerdo a esto $\mu_1 - \mu_2 < 0$ ó $\mu_2 - \mu_1 > 0$

Es decir: Podemos estar seguros estadísticamente (un 99.9% de las veces), de que en promedio, la efectividad de la meticilina es mejor que la efectividad de la cunmemicina.

A pesar de esto es más conveniente considerar el hecho de que las concentraciones mayores de 12.5 mcg/ml, no serán nunca utilizadas en el tratamiento de un paciente, puesto que ocasionaría efectos nocivos en él.

Una forma estadísticamente razonable de considerar esto, es tener en cuenta que cada una de las cepas inhibidas a las concentraciones que no deben utilizarse tengan como resultado un valor de cero, es decir, el medicamento nunca será utilizable en esas concentraciones, por lo que la tabla 2.2 se verá modificada y obtendríamos los valores mostrados a continuación.

TABLA 2.3

$\bar{Y}_1 = 0.00$	$\alpha_1(n-1) = 0.00$
$\bar{Y}_2 = 0.00$	$\alpha_2(n-1) = 0.00$
$\bar{Y}_3 = 0.00$	$\alpha_3(n-1) = 0.00$

$\bar{y}_4 = 0.97$	$\alpha_4(n-1) = 0.1714466$
$\bar{y}_5 = 0.95$	$\alpha_5(n-1) = 0.2190429$
$\bar{y}_6 = 0.54$	$\alpha_6(n-1) = 0.5009082$
$\bar{y}_7 = 0.17$	$\alpha_7(n-1) = 0.3775251$
$\bar{y}_8 = 0.03$	$\alpha_8(n-1) = 0.1714466$
$\bar{y}_9 = 0.00$	$\alpha_9(n-1) = 0.00$
$\bar{y}_{10} = 0.00$	$\alpha_{10}(n-1) = 0.00$

$$Y = \sum_{i=1}^{10} \frac{y_i}{10} = 0.266$$

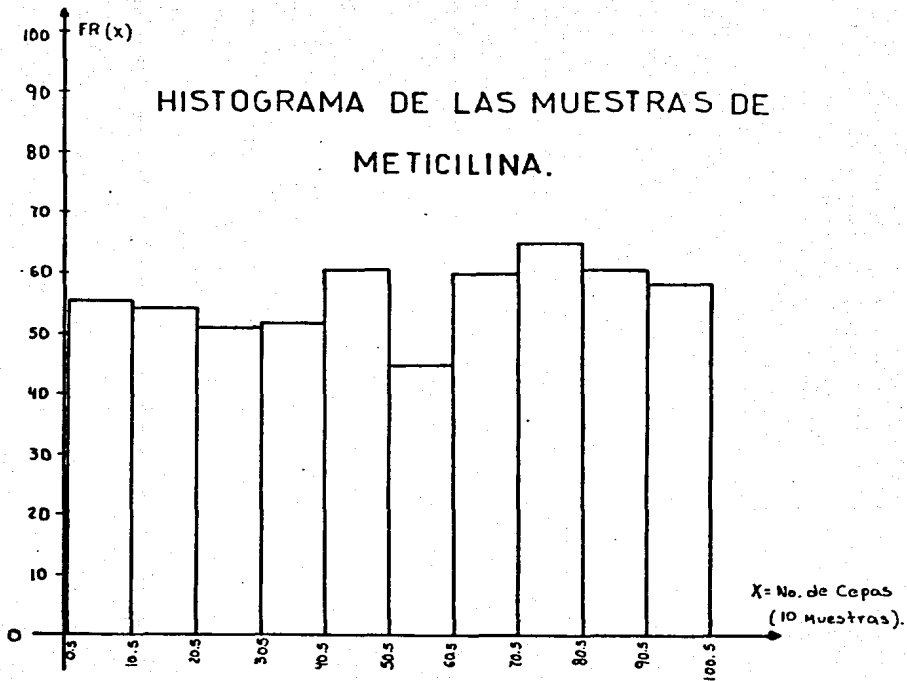
$$S_2 = 0.4023873$$

Si repetimos la prueba de hipótesis ahora con: -
 Ha : $\mu_1 - \mu_2 > 0$, tendríamos que la hipótesis nula se rechaza sí, Z = 3.29, y como $Z = \frac{0.4936 - 0.266}{\sqrt{\frac{(0.4317)^2}{1000} + \frac{(0.4024)^2}{1000}}}$

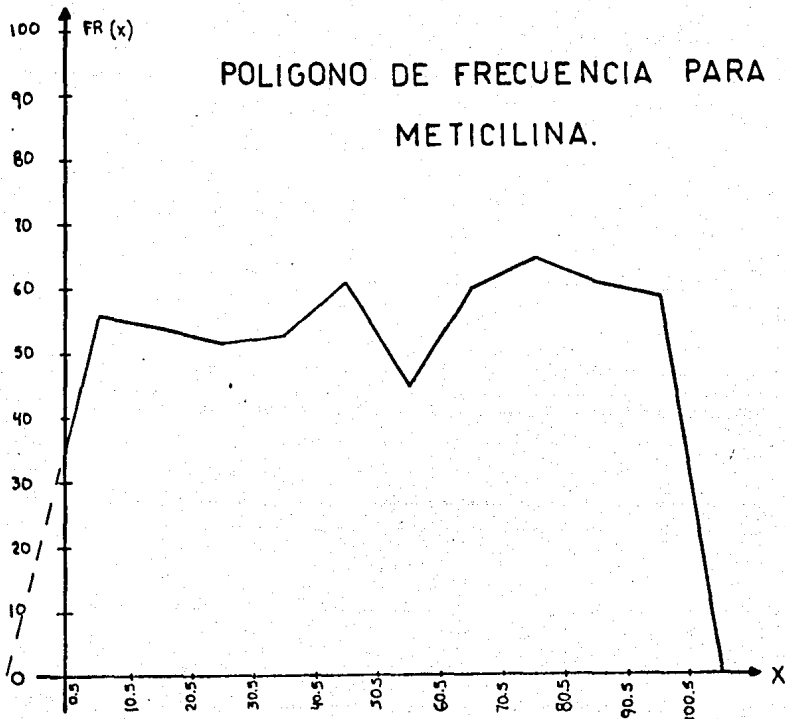
$$Z = 12.1667 > 3.29$$

y rechazamos H_0 para aceptar H_1 , y así para efectos prácticos la cumermicina es el 99.95 % de las veces más efectiva que la metecilina.

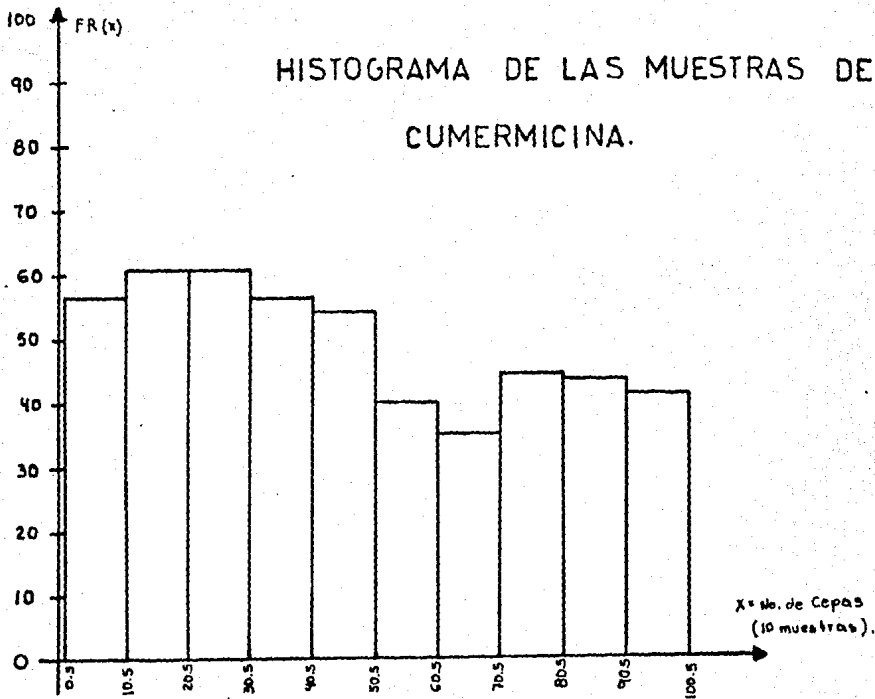
HISTOGRAMA DE LAS MUESTRAS DE METICILINA.



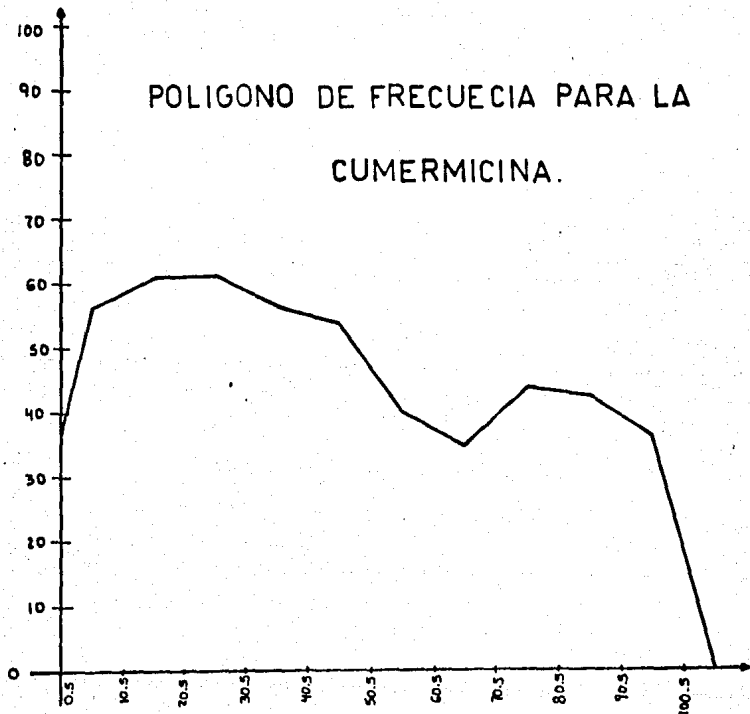
POLIGONO DE FRECUENCIA PARA LA METICILINA.



HISTOGRAMA DE LAS MUESTRAS DE CUMERMICINA.



POLIGONO DE FRECUENCIA PARA LA
CUMERMICINA.



CAPITULO 5

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

CUMERMICINA.

En base a los datos obtenidos durante esta investigación se puede observar que, el rango establecido para el antibiótico cumermicina (0.00195 - 1 en mcg/ml) , fue válido sólo para el 96 % de las 100 cepas probadas, ya que el establecido para este antibiótico después de la utilización de este método fue de 0.015625 - 1.0. Las cepas que necesitaron una concentración mayor que 1 mcg/ml fueron: Números 64, 67, 71 y 82.

METICILINA.

De los datos de la concentración mínima inhibitoria obtenidos durante esta investigación se observó que el rango de concentración establecido para realizar este trabajo fue el adecuado para probar dicha concentración para las 100 cepas utilizadas, puesto que todas tuvieron un rango dentro de los dos límites. La concentración establecida para el antibiótico metilicina fue de 0.1953 - 100 mcg/ml después de la investigación; para las 100 cepas fue de 0.78125-50.

En investigaciones realizadas anteriormente (14) , se considera a una cepa resistente a metilicina, si la -- concentración mínima inhibitoria para dicha cepa es mayor a 16 microgramos por mililitro. En el presente trabajo , sólo 3 de las cien cepas utilizadas fueron consideradas como metilicino-resistentes, pues su concentración mínima inhibitoria fue mayor de 16 mcg/ml. Dichas cepas fueron:

Cepa No.	CMI (mcg/ml)
53	50
59	25
60	25

Lo anterior indica que el 97 % de las cepas con las que se trabajó se clasificaron como meticilino-susceptibles, pues su CMI en mcg/ml tuvo un rango de: .7815-12.5.

COMPARACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE CUMERMICINA Y METICILINA.

Comparando los datos obtenidos durante la investigación se puede apreciar que existen diferencias en la inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus dependiendo del antibiótico utilizado. El rango de concentración mínima inhibitoria que se utilizó para Cumermicina no es válido para un 5 % de las cepas probadas; en cambio el rango utilizado para Meticilina es válido para el 100% de las cepas probadas. Las concentraciones de Cumermicina que se utilizaron para inhibir el crecimiento de las cepas son muy pequeñas comparadas con las concentraciones de Meticilina que se necesitan para inhibir el crecimiento de las mismas cepas. Entre más pequeña sea la concentración de antibiótico que se necesita para inhibir el crecimiento bacteriano, menor será el efecto nocivo que puede ocasionar en los diferentes sistemas del organismo.

Podemos concluir que de los dos antibióticos utilizados en la presente investigación (Cumermicina y Meticilina), Cumermicina será el antibiótico de elección para tratar las infecciones ocasionadas por Staphylococcus aureus, ya que aunque en este trabajo el antibióti-

co haya funcionado con eficiencia en un 95 % de las cepas probadas, las concentraciones que se requieren para inhibir a Staphylococcus aureus son muy pequeñas y esto favorece ampliamente su utilización.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bergey, David Hendrick. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8ava. Edición. Baltimore, The Williams and Wilkins Co., 1974.
- 2.- Bojalil Luis Felipe, Rodríguez Manuel, Santscoy G. - Guillermo, Sosa Martínez José. Microbiología Médica. Tomo I. 1a. Edición. México, Francisco Méndez Oteo, 1981.
- 3.- Burdon Kenneth L., Williams Robert P. Microbiología. - 5a. Reimpresión en Español, México, Publicaciones Cultural, 1980.
- 4.- Daguet, Chabbert. Exámenes de Laboratorio Tomo III. - Edición en Español, Barcelona, España, editorial - JIMS, 1977.
- 5.- Davis Bernard, Dulbecco Renato, Eisen Herman, Ginsberg Harold, Microbiology. 3a. Edición, Philadelphia, - USA, Harper and Row Publishers, 1980.
- 6.- Jawetz Ernest, Melnick Joseph, Adelberg Edward. Manual de Microbiología Médica. 9a. edición, México, Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., 1981.
- 7.- Lynch, Raphael, Mellor, Spare, Inwood. Métodos de Laboratorio. 2a. Edición, México, Editorial Interamericana, 1981.
- 8.- Meyers Frederik, Jawetz Ernest, Goldfien Alan. Manual de Farmacología Clínica. 3a. Edición, México, Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., 1977.

- 9.- Pumarola, Rodríguez-Torres, Piedrola-Angulo. Microbiología y Parasitología Médica. Edición en Español, - Barcelona, España, Salvat Editores, S.A., 1984.
- 10.- Todd-Sanford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. Edición, Barcelona, España, Salvat, Editores, - 1979.
- 11.- Aldridge, et al.- "Non-lactams Versus Methicillin - Resistant Staphylococcus aureus" Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 28, No. 5, November, 1985 . Pags. 634-637.
- 12.- Alvarez Salvador, Jones Mary, Berk Steven.- "In Vitro Activity of Fosfomicin, Alone and in Combination, - against Methicillin-Resistant Staphylococcus - - aureus". Antimicrobials Agents and Chemotherapy. - Vol. 28, No. 5, November, 1985. Pags. 689-690.
- 13.- Anhalt John P., Washington II John.- "Preparation and Storage of Antimicrobial Solutions". Analytical microbiology. Pags. 495-496.
- 14.- Bayer Arnold, Morrison Joan.- "Disparity Between Timed-Kill and Checkerboard Methods for Determination of In Vitro Bactericidal Interactions of Vancomycin Plus Rifampin Versus Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus". Antimicrobials Agents and Chemotherapy. -- Vol. 26, No. 2, August, 1984. Pags. 220-223.
- 15.- Cafferkey Mary T., Hone Rosemary, Keane Conor T.- -- "Antimicrobial Chemotherapy of Septicemias Due to -

- Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 28, No. 6, - December, 1981. Pags. 819-823.
- 16.- Lam Charles, Georgopoulos Apostolous, Laber Georg, -- Scütze.- "Terapeutic Relevance of Penicillin-Induced Hypersensitivity of Staphylococcus aureus to Killing by Polymorphonuclear Leukocytes". Antimicrobials - Agents and Chemotherapy. Vol. 26, No. 2, August, - - 1984, Pags. 149-154.
- 17.- Neu Harold C., Chin Nai-Xun, Labthavikul Pornpen.- - "Antibacterial Activity of Coumermycin Alone in Combination with Other Antibiotics". Antimicrobial - Agents and Chemotherapy. Vol. 25, No. 6, June, 1984. Pags. 687-689.
- 18.- Roche and Company. Solubility of Coumermycin (Ro-5-- 4645) Study 9/95. From. Roche Basle to Roche México.
- 19.- Sherris John C., Washington II John A.- "Laboratory Tests in Chemotherapy. American Journal Medical.- - Vol. 39, Pags. 766-779.
- 20.- Storcha Gregory A., Rajagopalan Lakshmy.- "Methicillin resistant Staphylococcus aureus bacteremia in children". Pediatric Infectious Disease. Vol. 5, No. 1, Pags. 59-62, 1986.