



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**CUAUTILÁN**

Estudio de la actividad antimicrobiana del extracto de *Thymus vulgaris* en las bacterias: *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

**VERÓNICA MORALES ANGEL**

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ  
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA  
M. en C. SOFÍA GONZÁLES GALLARDO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## INDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| INDICE GENERAL.....   | 1  |
| INDICE DE FIGURAS.....  | 4  |
| INDICE DE TABLAS.....   | 5  |
| INDICE DE GRÁFICAS.....   | 6  |
| <br>  |    |
| I.- ABREVIATURAS.....   | 7  |
| II.- RESUMEN.....   | 8  |
| III.- INTRODUCCIÓN.....   | 9  |
| 1.- Historia.....   | 9  |
| 2.- Enfermedades infecciosas.....                               | 10 |
| 2.1.- <i>Salmonella typhi</i> .....                             | 11 |
| 2.1.1.- Factores de virulencia.....                             | 12 |
| 2.1.2.- Epidemiología.....                                      | 13 |
| 2.1.3.- Tratamiento.....  | 13 |
| 3.- Infecciones nosocomiales.....                               | 13 |
| 4.- Resistencia a antibióticos.....                             | 14 |
| 4.1.- Resistencia intrínseca.....                               | 16 |
| 4.2.- Resistencia adquirida.....                                | 16 |
| 4.3.- Mecanismos de resistencia.....                            | 17 |
| 4.3.1.- Alteración de la permeabilidad.....                     | 18 |
| 4.3.2.- Expulsión del antimicrobiano.....                       | 19 |
| 4.3.3.- Inactivación o modificación enzimática.....             | 19 |
| 4.3.4.- Modificación o hiperproducción de la diana de acción... | 20 |
| 4.3.5.- Desarrollo de vías metabólicas alternativas.....        | 21 |
| 5.- Bacterias multiresistentes.....                             | 22 |
| 5.1.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....                        | 23 |
| 5.1.1.- Factores de virulencia.....                             | 23 |
| 5.1.2.- Epidemiología.....                                      | 24 |
| 5.1.3.- Incidencia de la resistencia a antibióticos.....        | 24 |
| 5.1.4.- Tratamiento.....  | 27 |
| 5.2.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                       | 27 |
| 5.2.1.- Factores de virulencia.....                             | 28 |
| 5.2.2.- Epidemiología.....                                      | 29 |
| 5.2.3.- Incidencia de la resistencia a antibióticos.....        | 29 |
| 5.2.4.- Tratamiento.....  | 31 |



|  |    |
|--|----|
| 5.3.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                 | 32 |
| 5.3.1.- Factores de virulencia.....                                      | 32 |
| 5.3.2.- Epidemiología.....   | 33 |
| 5.3.3.- Incidencia de la resistencia a antibióticos.....                 | 33 |
| 5.3.5.- Tratamiento.....   | 35 |
| 6.- Importancia de las plantas medicinales.....                          | 37 |
| 7.- Generalidades del Tomillo.....                                       | 38 |
| 7.1.- Nombre científico.....   | 38 |
| 7.2.- Descripción botánica.....  | 38 |
| 7.2.1.- Clasificación taxonómica.....                                    | 39 |
| 7.3.- Hábitat.....   | 39 |
| 7.4.- Partes utilizadas.....   | 39 |
| 7.5.- Historia.....  | 39 |
| 7.6.- Composición química.....   | 40 |
| 7.7.- Acciones farmacológicas.....                                       | 41 |
| 7.7.1.- Actividad Antimicrobiana.....                                    | 41 |
| 7.7.2.- Otros. ....  | 43 |
| 7.8.- Efectos adversos y/o tóxicos.....                                  | 43 |
| 7.9.- Contraindicaciones.....  | 45 |
| 7.10.- Interacciones medicamentosas.....                                 | 45 |
| 7.11.- Status legal.....   | 45 |
| IV.- JUSTIFICACIÓN.....  | 46 |
| V.- HIPÓTESIS.....   | 46 |
| VI.- OBJETIVO GENERAL.....   | 47 |
| VII.- OBJETIVOS PARTICULARES.....  | 47 |
| VIII.- METODOLOGIA.....  | 48 |
| 1.- Material.....  | 48 |
| 1.1.- Material de laboratorio.....                                       | 48 |
| 1.2.- Equipo.....  | 49 |
| 1.3.- Material biológico.....  | 49 |
| 1.4.- Reactivos.....   | 49 |
| 2.- Método.....  | 49 |
| 2.1.- Extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> .....                 | 49 |
| 2.2.- Esterilización de extracto.....                                    | 50 |
| 2.3.- Obtención de extracto seco.....                                    | 50 |
| 2.4.- Preparación de la solución Stock de <i>Thymus vulgaris</i> .....   | 51 |
| 2.5.- Prueba cualitativa de la actividad antibacterial del extracto..... | 51 |



|   |    |
|---|----|
| 2.6.- Preparación de Cepas Bacterianas.....   | 51 |
| 2.7.- Ensayo en Microplaca.....   | 52 |
| 2.8.- Lectura del ensayo en microplaca.....   | 53 |
| 2.9.- Ensayo Bactericida/Bacteriostático.....   | 54 |
| 2.10.- Técnica de Mosmann (Reactivo MTT).....   | 54 |
| 2.11.- Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).....  | 55 |
| 2.11.1.-Preparación de las rejillas con membranas de Parlodión amilo...   | 56 |
| 2.11.2.- Técnica de Tinción Negativa.....   | 56 |
| XI.- RESULTADOS.....  | 58 |
| 1.- Resultados de la prueba cualitativa para la determinación de inhibición de<br>crecimiento.....                        | 58 |
| 2.- Resultados de bioensayo del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria<br><i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 59 |
| 3.- Resultados de bioensayo del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 60 |
| 4.- Resultados de bioensayo del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria<br><i>klebsiella pneumoniae</i> .....  | 61 |
| 5.- Resultado de bioensayo del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria<br><i>Salmonella typhi</i> .....        | 62 |
| 6.-Resultados de la prueba bactericida / bacteriostático.....   | 63 |
| 7.-Fotografías obtenidas en la Microscopia Electrónica de Transmisión.....  | 64 |
| X.- DISCUSION GENERAL.....  | 66 |
| XI.- CONCLUSIONES.....  | 70 |
| XII.- BIBLIOGRAFIA.....   | 71 |
| APENDICE A.....   | 77 |
| APENDICE B.....   | 79 |
| APENDICE C.....   | 81 |



## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura No.1.-</b> Mecanismos de resistencia: a)transferencia de plásmidos, b)transferencia de fagos y c)transferencia de DNA libre.....  | 17 |
| <b>Figura No. 2.-</b> Mecanismos de resistencia bacterianos a antibioticos: a)Alteración en la permeabilidad de la membrana, b) Modificación enzimatica, c) Modificación de la diana de acción..... | 22 |
| <b>Figura No. 3.-</b> Planta de tomillo.....  | 38 |
| <b>Figura No. 4.-</b> Terpenos fenólicos del Tomillo.....   | 40 |
| <b>Figura No. 5.-</b> Bioensayo en Microplaca .....   | 53 |
| <b>Figura No. 6.-</b> Inhibición de crecimiento de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> tras la incubación con extracto de tomillo.....   | 58 |
| <b>Figura No. 7 .-</b> Efecto bacteriostático en <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 63 |
| <b>Figura No. 8.-</b> Efecto bacteriostático en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 63 |
| <b>Figura No. 9.-</b> Efecto bacteriostático en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....  | 63 |
| <b>Figura No. 10.-</b> Efecto bacteriostático en <i>Salmonella typhi</i> .....  | 63 |
| <b>Figura 11.-</b> Fotografía del Control de <i>Staphylococcus aureus</i> a 8000 Magnificaciones.....   | 64 |
| <b>Figura 12.-</b> A y B <i>Staphylococcus aureus</i> con extracto a 10000 magnificaciones....  | 65 |
| <b>Figura 13.-</b> C ) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> control a 8000 magnificaciones<br>D) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con extracto a 8000 magnificaciones a 6000 magnificaciones.....             | 65 |



## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla No. 1.-</b> <i>Staphylococcus aureus</i> : Porcentaje de resistencia, 2004.....   | 25 |
| <b>Tabla No 2.-</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; porcentaje de resistencia, 2004.....   | 30 |
| <b>Tabla No. 3.-</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; porcentaje de resistencia 2004.....  | 34 |
| <b>Tabla No 4.-</b> Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 59 |
| <b>Tabla No. 5.-</b> Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 60 |
| <b>Tabla No. 6.-</b> Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....  | 61 |
| <b>Tabla No. 7.-</b> Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> con la bacteria <i>Salmonella typhi</i> .....       | 62 |



## INDICE DE GRAFICAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Gráfico No. 1.-</b> <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (oxacilina) en pacientes de UAG.....                                      | 25 |
| <b>Gráfico No. 2.-</b> <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (oxacilina) en pacientes de UCI.....                                      | 25 |
| <b>Gráfico No. 3.-</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a Fluoroquinolonas en pacientes de UAG.....   | 30 |
| <b>Gráfico No. 4.-</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a Fluoroquinolonas en pacientes de UCI.....   | 31 |
| <b>Gráfico No. 5.-</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a Cefalosporinas de 3ª generación en pacientes de UAG.....                             | 34 |
| <b>Gráfico No. 6.-</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a Cefalosporinas de 3ª generación en pacientes de UCI.....                             | 35 |
| <b>Gráfico No. 7.-</b> Efecto inhibitorio del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> a diferentes concentraciones con <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 59 |
| <b>Gráfico No. 8.-</b> Efecto inhibitorio del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> a diferentes concentraciones con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 60 |
| <b>Gráfico No. 9.-</b> Efecto inhibitorio del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> a diferentes concentraciones con <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....  | 61 |
| <b>Gráfico No. 10.-</b> Efecto inhibitorio del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> a diferentes concentraciones con <i>Salmonella typhi</i> .....      | 62 |



## ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| Amp C | Adenosín Monofosfato Cíclico                         |
| BHI   | Infusión Cerebro Corazón                             |
| BLEE  | Beta Lactamasas de Expectro Extendido                |
| CDC   | Centros para el Control y Prevención de enfermedades |
| CMI   | Concentración Mínima Inhibitoria                     |
| CPSs  | Polisacaridos Capsulares                             |
| DMSO  | Dimetil Sulfoxido                                    |
| L     | Litro  |
| LPS   | Lipopolisacarido                                     |
| µg    | Microgramos  |
| µl    | Microlitros  |
| ml    | Mililitros   |
| MRSA  | Staphylococcus aureus Meticilino Resistentes         |
| MTT   | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol      |
| OMS   | Organización Mundial de la salud                     |
| ORF's | Marcos de lectura abierta                            |
| PBP   | Proteína fijadoras a penicilina                      |
| SEs   | Enterotoxina estafilococicas                         |
| SSF   | Solución Salina Fisiológica                          |
| SSFE  | Solución Salina Fisiológica Estéril                  |
| UAG   | Unidad de Atención General                           |
| UCI   | Unidad de Cuidados Intensivos                        |



## RESUMEN

La selección del tratamiento adecuado para las infecciones en la actualidad es más difícil, ya que en los últimos 50 años se ha incrementado la resistencia bacteriana a antibióticos, esto ocasiona el aumento de la estancia en unidades hospitalarias, al igual que los costos de tratamiento, los cuales en muchos de los casos son insuficientes, por lo que las infecciones a nivel comunitario y nosocomial han aumentado en grado de morbilidad y mortalidad.

El objetivo del trabajo fue la evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de *Thymus vulgaris* contra *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; las cuales se obtuvieron del cepario del laboratorio No.10 de la unidad de posgrado. Para poder llevar a cabo la evaluación del extracto donado por EXTRACTOS SIGMA, se llevo a cabo la esterilización de este con membranas estériles, verificada por medio de una prueba cualitativa, la que resulto satisfactoria, se concentro el extracto y se preparo una solución Stock de 100mg/ml, partiendo de la solución preparada se llevaron a cabo los bioensayos en microplacas evidenciando la inhibición del crecimiento de la bacteria por medio del grado de turbidez en los pozos y la técnica colorimétrica de Mosmann, determinando las concentraciones minimas inhibitorias con las lecturas espectrofotometricas, a la par se corrieron pruebas para determinar el efecto ejercido por el extracto (bactericida/bacteriostático) y por último se observaron las bacterias a través de Microscopía Electrónica de Transmisión para tratar de dilucidar el mecanismo de acción contra la bacteria.

De las bacterias utilizadas en los bioensayos se determino que las Gram (-) fueron más sensibles al extracto, ya que para *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* se determino una CMI de 1562.5µg/ml y para *Pseudomonas aeruginosa* de 3125µg/ml, mientras que en la única bacteria Gram(+) de este estudio *Staphylococcus aureus* se determino una CMI de 12500µg/ml, observándose en todos los casos que el extracto actúa presuntivamente y principalmente a nivel de membrana y pared celular, debido a la presencia de protoplastos y esferoplastos; sin embargo no inhibe el crecimiento, concluyendo que el efecto del extracto es bacteriostático.



## INTRODUCCIÓN

### 1.- HISTORIA.

¿Se podría imaginar la emoción que sintió en 1674 el biólogo holandés Antón Van Leeuwenhoek cuando examinó con sus lentes de microscopio una gota de agua y descubrió un mundo formado por millones de diminutos «animáculos»? Aproximadamente cien años después el biólogo danés Otto Müller amplió los estudios de Van Leeuwenhoek y, siguiendo los métodos de clasificación de Carlos Linneo, organizó a las bacterias en géneros y especies. Se trataba del inicio de la clasificación taxonómica de los microorganismos. En 1840, el anatomopatólogo alemán Friedrich Henle propuso unos criterios para demostrar que los microorganismos eran responsables de la aparición de enfermedades en el ser humano (la denominada «teoría de los gérmenes» de las enfermedades). En los años setenta y ochenta del mismo siglo, Robert Koch y Louis Pasteur confirmaron esta teoría mediante una serie de elegantes experimentos en los que demostraron que los microorganismos eran responsables de la aparición del carbunco, la rabia, la peste, el cólera y la tuberculosis.<sup>3</sup>

Más adelante, otros brillantes científicos confirmaron que una amplia variedad de microorganismos producían otras enfermedades humanas. La era de la quimioterapia comenzó en 1910, cuando el químico alemán Paul Ehrlich descubrió el primer compuesto antibacteriano, que resultó efectivo contra la espiroqueta causante de la sífilis. Los años posteriores asistieron al descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, la sulfanilamida en 1935 por Gerhard Domagk y la estreptomycinina por Selman Waksman en 1943. En 1946, el microbiólogo estadounidense John Enders fue el primero en cultivar virus en cultivos celulares, proporcionando así un medio para la producción a gran escala de cultivos víricos para el desarrollo de vacunas.<sup>3</sup>

Los primeros pasos de estos innovadores investigadores han sido seguidos por miles de científicos que, trabajando con los fundamentos establecidos por sus predecesores, han añadido más y más datos para ampliar los conocimientos sobre los microorganismos y el papel que ejercen en la aparición de las enfermedades.<sup>3</sup>



## 2.- ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

La interacción entre un microorganismo y el ser humano es compleja. Puede producir tanto una colonización transitoria o una relación simbiótica crónica o bien la aparición de una enfermedad. El resultado final de esta interacción se encuentra determinado por la virulencia del microorganismo, el lugar de la exposición y la capacidad de respuesta del organismo anfitrión. Por tanto, las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar desde síntomas leves hasta el fracaso multiorgánico y la muerte del individuo.<sup>3</sup>

Las enfermedades infecciosas son problemas globales de la salud <sup>1</sup>; constituyen la primera causa de morbi mortalidad a nivel mundial, en especial en países subdesarrollados como el nuestro, por ello el tratamiento adecuado y oportuno de las mismas, tendrá un impacto importante en los índices de salud.<sup>9</sup>

El ámbito y el foco de estas enfermedades cambian continuamente. La distribución de las enfermedades en el mundo puede variar de forma espectacular y rápidamente. Alteraciones en el patógeno, en el ambiente o en la población de huéspedes pueden contribuir a la rápida expansión de nuevas enfermedades con potencial para una elevada morbilidad y mortalidad entre los individuos afectados.<sup>1</sup>

Algunos factores responsables de la emergencia de nuevos patógenos son<sup>1</sup>:

- La demografía y el comportamiento humano.
- La tecnología y la industria.
- El desarrollo económico y el uso de tierra.
- Los vuelos y el comercio internacional.
- La adaptación y los cambios microbianos.
- La rotura de medidas de sanidad pública.
- La aparición de hechos anormales que afectan el equilibrio normal hospedador-patógeno.

A pesar que el organismo humano está muy adaptado a controlar la exposición a microorganismos patógenos por medio de distintas barreras físicas que impiden su invasión; o que las respuestas innatas reconocen patrones moleculares característicos de los componentes microbianos y activan los mecanismos de defensa local y las respuestas inmunes específicas que actúan contra el microorganismo con el propósito de eliminarlo. Lamentablemente, la respuesta inmune es, con frecuencia, excesivamente tardía o lenta. Para mejorar la capacidad de prevención de la infección del organismo humano, se puede potenciar el sistema inmunológico mediante la transferencia pasiva de



anticuerpos incluidos en preparaciones de inmunoglobulinas o mediante la vacunación con componentes microbianos. Las infecciones también se pueden controlar mediante compuestos quimioterápicos diversos.<sup>3</sup>

El ser humano sin duda alguna no es un ser aislado, este debe relacionarse con lo que se encuentra en el ambiente, de esta forma se establecen diversos tipos de interacciones, en el caso de las bacterias pueden ser comensales y parasitarias principalmente.

Es inminente el hecho de que el ser humano y las bacterias poseen una estrecha relación, por la simple lógica en que ambos se encuentran en el mismo ambiente, pero muchas de estas relaciones son de carácter parasitario, lo que ocasiona daño al hombre; Un claro ejemplo de las interacciones parasitarias, que traen como resultado enfermedades, es la fiebre tifoidea, la cual es una enfermedad propia del hombre causada por una bacteria Gram negativa:

### **2.1.- *Salmonella typhi*.**

La salmonelosis se considera un problema de salud pública mundial. *Salmonella enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos. En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia, que les permite conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto de cada una de éstas en la morbilidad y mortalidad de la población.<sup>21</sup>

La comunidad científica y las autoridades sanitarias asumen que, en general, los pollos, cerdos y bovinos son los reservorios mas frecuentes de *Salmonella*; que la ingestión de alimento directa o indirectamente contaminado es la causa más común de las infecciones en el humano; y que todas las serovariedades tienen el mismo grado de patogenicidad. Por las dificultades técnicas y logísticas, existen pocos estudios sobre la transmisión de este patógeno a lo largo de toda la cadena alimenticia y las condiciones necesarias para producir enfermedad en un huésped humano. Por ende, la legislación referente a inocuidad alimentaria establece medidas de control o límites de tolerancia basados en información epidemiológica obtenida de estudios transversales realizados en las naciones industrializadas. En muchas ocasiones esta información no puede ser extrapolada al panorama de los países en desarrollo.<sup>21</sup>



En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas, entraña para la salud de los seres humanos. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*.<sup>21</sup>

El aumento progresivo de resistencia antimicrobiana de los patógenos entéricos, particularmente *Shigella*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*, es un problema crítico para la población que vive en países en vías de desarrollo donde existen altos porcentajes de enfermedades diarreicas agudas que están generalmente asociadas a la mortalidad infantil. Se estima que en países subdesarrollados, cerca de 4 millones de niños menores de 5 años mueren por año por gastroenteritis aguda donde la desnutrición es un factor adicional de alto riesgo tanto en la diarrea aguda como en la persistente donde en muchos casos, se requiere tratamiento antimicrobiano.<sup>7</sup>

### **2.1.1.- FACTORES DE VIRULENCIA.**

El género *Salmonella* fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith, recibiendo el nombre por su jefe David Salmon. Las salmonellas son bacterias entéricas, y su taxonomía es compleja.<sup>21</sup>

<sup>21</sup>*Salmonella typhi*, posee factores de virulencia que el permiten invadir células, multiplicarse y evadir la respuesta inmune, estos factores son:

- Fimbrias tipo SEF18.<sup>53</sup>
- Proteína de unión SipE.<sup>53</sup>
- Enterotoxina similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT), y toxina termilábil (LT) de *Escherichia coli*.<sup>53</sup>
- Islas de patogenicidad: SPI-2, SPI-6, SPI-7, SPI-8, SPI-9 y SPI-10.<sup>53</sup>



### **2.1.2.- EPIDEMIOLOGIA.**

Anualmente, en el mundo hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea, resultando en 600,000 muertes. En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea.<sup>18</sup> Es relevante insistir, como se mencionó con anterioridad, que esta incidencia se basa primordialmente en una valoración clínica, sin que se hayan aplicado métodos confiables de diagnóstico. Esto implica, por tanto, un grado de incertidumbre en la estadística.<sup>21</sup>

### **2.1.3.- TRATAMIENTO.**

B-lactámicos: Como Penicilina, Ampicilina, Carbenicilina y cefalotina.

Aminoglucosidos: Como la Estreptimicina, Neomicina, Gentamicina, Teraciclina, Cloranfenicol, Polimixina B y Sulfamidas.

Las infecciones son procesos que históricamente han acompañado a los hospitales con mayor o menor incidencia, según la situación económico-social de que se trate, y constituyen un importante problema de salud y un motivo de preocupación para las instituciones y organizaciones de la salud a escala mundial, por las implicaciones económicas, sociales y humanas que estas tienen.<sup>5</sup>

## **3.- INFECCIONES NOSOCOMIALES.**

El problema de las infecciones nosocomiales se hizo latente desde el comienzo de los hospitales como instituciones de caridad, en el año 325 d.n.e, pero su presencia ligada a la cirugía es tan antigua como las intervenciones quirúrgicas de trepanación de cráneo, reducciones de fracturas y otras, practicadas por el hombre desde 3000 años a.n.e. El conocimiento del problema mediante estudios aislados se inicia más recientemente en la década de los 50 del siglo XX, con los estudios de focos de infección en hospitales, por investigadores de Inglaterra, Escocia y del CDC. Posteriormente, en los años 60, se llevan a cabo estudios más sistemáticos y organizados, y ya en la década de los 70 surgen en muchas partes del mundo programas de vigilancia y control de las infecciones nosocomiales.<sup>5</sup>



Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de gran trascendencia económica y social, además de ser un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable. Estas son de importancia clínica y epidemiológica porque condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad e inciden en los años de vida potencialmente perdidos de la población que afectan, a lo cual se suma el incremento en los costos de atención.<sup>5</sup>

En gran medida las infecciones nosocomiales al igual que las infecciones comunitarias, se ven favorecidas por la presencia de microorganismos resistentes al tratamiento convencional, por esta razón el paciente requiere un mayor número de días en el centro de salud, al igual que el uso de nuevos fármacos.

#### **4.- RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.**

La resistencia a antimicrobianos es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente. La mayor parte de la resistencia a antimicrobianos es debida a genes de resistencia que se transfieren por intercambio genético.<sup>1</sup>

Así, el proceso de selección de la resistencia es un fenómeno natural que se incrementa con el abuso y el uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas; esto es debido a que en países en vías de desarrollo, donde los antibióticos alternativos no están muy comercializados o son muy costosos hacen que prevalezca la auto administración de antibióticos, además de la facilidad al acceso sin prescripción médica y su uso inapropiado y excesivo son los principales condicionantes de la resistencia bacteriana que sumadas a las condiciones sanitarias deficientes y hacinamiento permiten su rápida diseminación en regiones pobres y en desarrollo. Este fenómeno afecta no solo a los patógenos bacterianos sino también a las bacterias de la flora normal, sobre todo a las provenientes del tracto intestinal que podrían adquirir multiresistencia a diferentes antibióticos debido a la frecuente exposición por la administración vía oral de los mismos. De esta manera la flora comensal puede considerarse un reservorio de genes de resistencia.<sup>7,9</sup>

La resistencia a antimicrobianos no solo es un problema que repercute en el sector salud de una región o un país, sino también económicamente ya que el descubrimiento de nuevos medicamentos es mucho más lento que el surgimiento de genes de resistencia, además de el elevado costo que involucra la elaboración de estos medicamentos.



Asimismo causan un mayor costo por la prolongación de la estancia hospitalaria y complicaciones. Se calcula que el costo anual en los Estados Unidos por la resistencia antibiótica es entre 100 millones y 30 billones de dólares.<sup>30</sup>

El fenómeno biológico de la resistencia depende de la aparición y conservación de los genes de resistencia, como elementos génicos cromosómicos y extracromosómicos. En otras palabras es la modificación en el genoma lo que determina la aparición de dichos genes; estos cambios se clasifican en microevolutivos y macroevolutivos. Los primeros son el resultado de mutaciones únicas que comprometen nucleótidos apareados, mientras las macroevolutivas afectan segmentos de ADN.<sup>7</sup>

La transferencia horizontal de genes de multiresistencia favorece su distribución entre diferentes bacterias de una y de diferente especie. En 1990, se descubrió además, un elemento genético asociado a la resistencia que involucra la integración, por el mecanismo de recombinación específica, de uno o varios genes de resistencia bajo el control de un solo promotor. Este elemento se conoce como integrón y se encuentra como parte de los transposones de la familia Tn21 o independientemente, en diferentes grupos de plásmidos y cromosomas.<sup>7</sup>

Los integrones son sistemas de expresión genética que incorporan varios marcos de lectura abierta (ORF's) y los convierten en genes funcionales. Los integrones promueven la captura de uno o más cassettes genéticos dentro del mismo sitio de unión, por lo tanto, forman grupos o clusters de genes de resistencia antimicrobiana. Se conocen hasta el presente 5 diferentes clases de integrones, que se distinguen por su respectivo gen de la integrasa y que comprenden alrededor de 60 genes de resistencia organizados en cassettes de resistencia. La asociación de integrones con elementos móviles promueve la transmisión horizontal entre plásmidos y cromosomas así como entre diferentes replicones, contribuyendo de esta manera a la diseminación de genes de resistencia. Los integrones han sido encontrados en bacterias patógenas resistentes a antibióticos, Gram negativas y Gram positivas que circulan en hospitales y en la comunidad.<sup>7</sup>

Debido a que la resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos, puede ser intrínseca o adquirida.<sup>15,17,20</sup>



#### **4.1.- RESISTENCIA INTRÍNSECA.**

Cuando la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico frente a esa especie bacteriana es superior a la que inhibe normalmente a otras bacterias de características similares. Esto puede deberse a las características del antimicrobiano o de la bacteria que impiden el acceso normal del fármaco al lugar específico de acción, a modificaciones naturales de la diana de acción o cuando toda una población bacteriana produce de modo natural un mecanismo de resistencia. La resistencia intrínseca es por tanto especie o género específica y delinea el espectro de actividad del antibiótico. Un ejemplo de resistencia intrínseca, es la que presentan las enterobacterias a la vancomicina y a la eritromicina. El gran tamaño de estas moléculas impide su acceso a través de la pared celular bacteriana de modo que la vancomicina no puede actuar sobre los residuos D-alanil-D-alanina de los péptidos de la membrana y la eritromicina tampoco sobre la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Otro ejemplo sería el de la resistencia de los enterococos a las cefalosporinas, debido a que sus proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs) tienen baja afinidad por estos beta-lactámicos, y en consecuencia no pueden ejercer su acción. No debe confundirse la resistencia intrínseca con la resistencia natural o resistencia constitucional que implica la insensibilidad de la bacteria por carecer de la estructura sobre la cual ha de actuar el antibiótico. Un ejemplo de ello es el de la resistencia de las bacterias grampositivas a la polimixina. Este antibiótico actúa sobre la membrana externa de los microorganismos gramnegativos, estructura ausente en las bacterias grampositivas.<sup>32,33</sup>

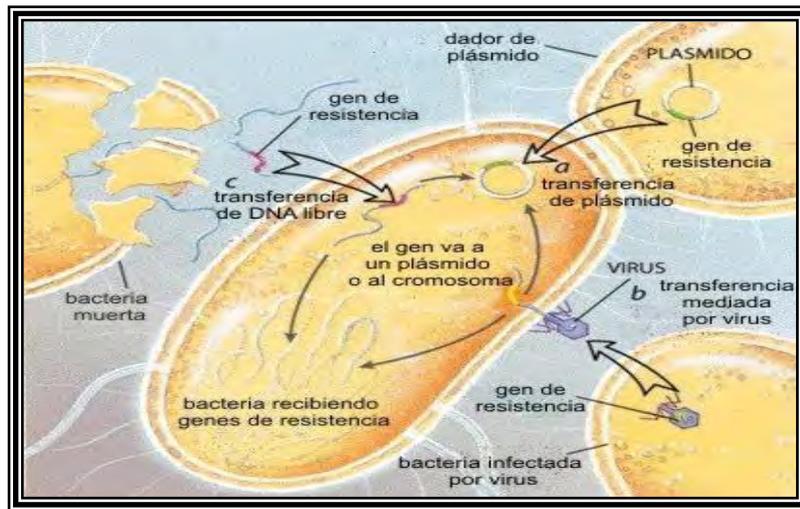
#### **4.2.- RESISTENCIA ADQUIRIDA.**

Implica el desarrollo o adquisición de un mecanismo de resistencia en un microorganismo que carece de él, y por tanto, solamente estará presente en ciertas cepas o ciertas especies de un género. La resistencia adquirida puede producirse por la mutación de genes cromosómicos ya existentes, por la adquisición de material genético ajeno (plásmidos o transposones) o por la mutación del material genético adquirido. Los mecanismos de resistencia pueden ser específicos de un solo antimicrobiano o afectar a más de un fármaco, bien de la misma familia o a varios antimicrobianos estructuralmente no relacionados entre sí. Los ejemplos del primer caso no son frecuentes, y entre ellos destaca la resistencia a cloranfenicol por la producción de la enzima cloranfenicol-acetil transferasa, o la resistencia debida a la fosfotransferasa APH(3'') que afecta exclusivamente a la estreptomina y no a otros aminoglucósidos. Sin embargo, es más frecuente que la resistencia afecte a varios antimicrobianos de una misma familia, a lo



que se denomina resistencia cruzada. Por ejemplo, la resistencia de *Escherichia coli* a las aminopenicilinas por la producción de la beta-lactamasa TEM-1 afecta también a las carboxipenicilinas y a las ureidopenicilinas, y la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina por la producción de una proteína fijadora de penicilina modificada (PBP2a) afecta a todos los antibióticos beta-lactámicos.<sup>32,33</sup>

**Figura No. 1.-** Mecanismos de resistencia: a) transferencia de plásmidos, b) transferencia de fagos y c) transferencia de DNA libre



Tomado (34)

#### 4.3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Para que un antimicrobiano pueda ejercer su acción ha de acceder a su sitio blanco, interactuar con las dianas, e inhibir eficazmente su función.<sup>32,33</sup>

Las bacterias han desarrollado distintos mecanismos para resistir a la acción de los antimicrobianos de diversas formas<sup>32,33</sup>:

- Impidiendo el acceso del antimicrobiano al lugar específico de acción.<sup>32,33</sup>
- Eliminando o expulsando el antibiótico para evitar que pueda acceder a su diana.<sup>32,33</sup>
- Inactivando o modificando la estructura química del antimicrobiano.<sup>32,33</sup>
- Alterando o hiperproduciendo la diana de acción.<sup>32,33</sup>
- Desarrollando vías metabólicas alternativas que suplan la inhibida por el antibiótico.

Los cuatro primeros mecanismos pueden ser debidos a mutaciones cromosómicas o mediados por plásmidos, mientras que el último se suele producir por la adquisición de plásmidos o transposones.<sup>32,33</sup>



#### **4.3.1.- ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD.**

La membrana celular bacteriana es la primera barrera que debe superar el antimicrobiano para ejercer su acción. La diferente estructura de la membrana de las bacterias grampositivas y gramnegativas explica ya las diferencias de actividad de algunos antibióticos frente a estos microorganismos.<sup>32,33</sup>

Por otra parte, los antibióticos pueden penetrar al interior celular por difusión pasiva, por transporte específico, por transporte activo dependiente de energía o a través de canales (porinas) en las bacterias gramnegativas y cualquier alteración en estos mecanismos puede conducir a resistencia. En el primer caso es difícil alterar este proceso, ya que esto afectaría a la viabilidad celular por implicar cambios en la estructura de la membrana celular que podrían ser letales para la bacteria. El transporte específico, necesita una proteína transportadora que suele tener una función fisiológica en la bacteria y que además se aprovecha para el transporte de algún antimicrobiano, por lo que la modificación de este transportador afecta a la entrada del antibiótico. Tal es el caso de la fosfomicina, que penetra en la bacteria aprovechando el sistema de transporte de la glucosa-6 fosfato. Si este sistema se modifica, la acción de la fosfomicina se ve afectada.<sup>32,33</sup>

El transporte dependiente de energía es más complejo y está regulado por un gradiente electroquímico de protones. La alteración de este sistema, que supone una afectación en la estructura de la membrana citoplasmática, es uno de los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos, ya que se reduce el potencial de energía y no se logra un transporte eficaz del aminoglucósido.<sup>32,33</sup>

Por último, en los microorganismos gramnegativos la entrada de algunos antibióticos se facilita por la presencia de canales específicos denominados porinas, canales que utilizan los beta-lactámicos. En las enterobacterias, la pérdida o la disminución del número de copias de la porina OmpF reduce la sensibilidad a ciertos beta-lactámicos, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa*, la pérdida de la porina OprD, conduce a la resistencia a imipenem. El nivel de resistencia que confieren las alteraciones de la permeabilidad no suele ser elevado, y cuando se produce, afecta a antimicrobianos no relacionados entre sí. Aunque la mayoría de los problemas de permeabilidad se deben a mutaciones en genes cromosómicos que se pueden producir durante el tratamiento antimicrobiano, se ha demostrado que en el caso de la resistencia a cloranfenicol y a las tetracilinas por modificaciones en el transporte la codificación genética está en elementos transferibles.<sup>32,33</sup>



#### **4.3.2.- EXPULSIÓN DEL ANTIMICROBIANO.**

La eliminación del antimicrobiano antes de que pueda acceder a su diana de acción es un mecanismo de resistencia dependiente de energía. En la mayoría de las ocasiones la energía se obtiene de las diferencias de potencial en la membrana aunque en otras depende del ATP. Se han descrito varios sistemas de expulsión o bombeo en los que participan distintas proteínas de membrana especializadas. En condiciones normales y en ausencia de antibióticos, estas proteínas tienen una función fisiológica de detoxificación y eliminación de sustancias metabólicas. Algunos de estos sistemas producen resistencias pleiotrópicas que afectan a distintas clases de antimicrobianos, como beta-lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol e incluso a compuestos de amonio cuaternario como antisépticos y desinfectantes. La coexistencia de alteraciones en las porinas de entrada con un sistema eficaz de expulsión eleva notablemente los niveles de resistencia a los antimicrobianos, ya que es menor la cantidad de antibiótico a expulsar. El modelo de bomba de expulsión más conocido es el mexA-mexB-OprM, descubierto en *Pseudomonas aeruginosa* y que confiere resistencia a las tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas y a algunos beta-lactámicos. Este sistema participa en el transporte al exterior de la pioverdina, compuesto que actúa como sideróforo.<sup>32,33</sup>

Los determinantes genéticos de estos sistemas de expulsión activa pueden localizarse tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano.<sup>33</sup>

#### **4.3.3.- INACTIVACIÓN O MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA.**

Estos mecanismos suelen ser muy específicos, y afectan a una sola familia de antibióticos e incluso a un único antibiótico, ya que es necesario un reconocimiento del sustrato por parte del enzima, lo que conduce a una acción hidrolítica o modificación de la estructura química del antibiótico. Los enzimas implicados en este mecanismo de resistencia pueden ser hidrolasas, fosfotransferasas, adeniltransferasas y acetilasas.<sup>32,33</sup>

Las hidrolasas suelen actuar en la superficie de la bacteria, ya sea en el periplasma (bacterias gramnegativas) o en el exterior (bacterias grampositivas), como ocurre con las beta-lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico, o las esterases, que abren el anillo lactónico de la eritromicina. Por el contrario, el resto de las enzimas ejercen su efecto en el citoplasma, aunque se suelen situar en la membrana citoplasmática. Las fosfotransferasas y adeniltransferasas necesitan una fuente de grupos fosfato y adenilo, respectivamente, procedente del ATP. En el caso de los aminoglucósidos, los grupos



transferidos se unen covalentemente a radicales hidroxilo. Las acetilasas transfieren grupos acetilo del acetyl Co-A a grupos amino en los aminoglucósidos o hidroxilo en el cloranfenicol. Asimismo, se han descrito fosfotransferasas que afectan a los macrólidos y a la rifampicina, y adeniltransferasas que actúan sobre las lincosamidas.<sup>32,33</sup>

El grado de resistencia que confieren estas enzimas es variable y depende de diferentes factores, y sus determinantes genéticos son de naturaleza cromosómica y plasmídica, y con relativa frecuencia, también se asocian a transposones, razón por la cual algunas de estas enzimas están muy difundidas, particularmente las beta-lactamasas, las enzimas modificantes de aminoglucósidos y la cloranfenicol-acetil transferasa.<sup>32,33</sup>

#### **4.3.4.- MODIFICACIÓN O HIPERPRODUCCIÓN DE LA DIANADE ACCIÓN.**

La mayoría de los antibióticos ejercen su acción al unirse específicamente a diferentes proteínas que forman parte de procesos esenciales para la supervivencia de la bacteria. En los mutantes resistentes, la modificación de estas proteínas puede afectar a su afinidad por el antibiótico pero sin interferir con su funcionalidad. En la mayoría de los mutantes es suficiente un solo cambio de un aminoácido en la proteína para que se produzca este efecto. Las proteínas que se pueden modificar son las proteínas ribosómicas, la alteración de los precursores de la pared celular y la modificación de enzimas esenciales. La modificación de las proteínas ribosómicas confiere resistencia a los aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas, por lo que se impide la acción de todos estos antimicrobianos como inhibidores de la síntesis de proteínas.<sup>32,33</sup>

Ejemplos de este tipo de resistencia son la resistencia a estreptomycin de *Micobacterium tuberculosis*, la resistencia a eritromicina de estafilococos, estreptococos, enterococos y algunos microorganismos anaerobios y la resistencia a tetraciclina en microorganismos grampositivos, gramnegativos e incluso *Mycoplasma* y *Ureaplasma*.<sup>32,33</sup>

Respecto a la alteración de los precursores de la pared celular, en el género *Enterococcus*, la síntesis de depsipéptidos con un residuo terminal D-alanina-D-lactato, en vez de los péptidos habituales del péptido glicano terminados en D-alanina-D-alanina, afecta a la unión de vancomicina y teicoplanina con estos precursores de la pared. Este mecanismo de resistencia tiene gran importancia epidemiológica, ya que los



enterococos presentan resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos y los glicopéptidos son una de las pocas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones producidas por estos microorganismos. En cuanto a las enzimas esenciales que participan en distintos procesos del metabolismo bacteriano y que son diana de múltiples antimicrobianos, su modificación puede dar lugar a la resistencia a beta-lactámicos, quinolonas, sulfamidas, trimetoprim, rifampicina y novobiocina. La alteración de las PBPs, proteínas que catalizan la síntesis del péptido glicano, determina resistencia a los beta-lactámicos. Este mecanismo es más importante en las bacterias grampositivas que en las gramnegativas, y tiene particular importancia en *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus*, en las que determina resistencia a penicilina, y en *Staphylococcus aureus*, que le confiere resistencia a todos los beta-lactámicos. Las mutaciones en *gyrA* o *gyrB*, genes responsables de la síntesis de las dos subunidades de la enzima ADN-girasa, afectan a su afinidad por las quinolonas. La resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a la rifampicina se debe a mutaciones en el gen *rpoβ*, responsable de la síntesis de la subunidad  $\beta$  de la ARN-polimerasa.<sup>32,33</sup>

La resistencia a sulfamidas y a trimetoprim puede deberse a la presencia de enzimas modificadas, dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa, respectivamente. Sin embargo, el incremento en la síntesis de enzimas no modificadas puede dar lugar a una inhibición parcial de estas enzimas por parte del antibiótico y la consiguiente aparición de resistencia. Esta mayor producción de la diana también se ha observado en *Enterococcus*, en el que también la hiperproducción de PBPs puede contribuir a su resistencia a la ampicilina. Por último, existen mutantes que son resistentes y dependientes a la vez de un antibiótico determinado y que sólo son capaces de desarrollarse en presencia del antibiótico. Este hecho puede explicarse por la producción de dianas alteradas que solamente son funcionales cuando se modifican por el antibiótico. Entre éstas están algunas cepas de *Enterococcus* dependientes de vancomicina o de *M. tuberculosis* dependientes de estreptomina.<sup>32,33</sup>

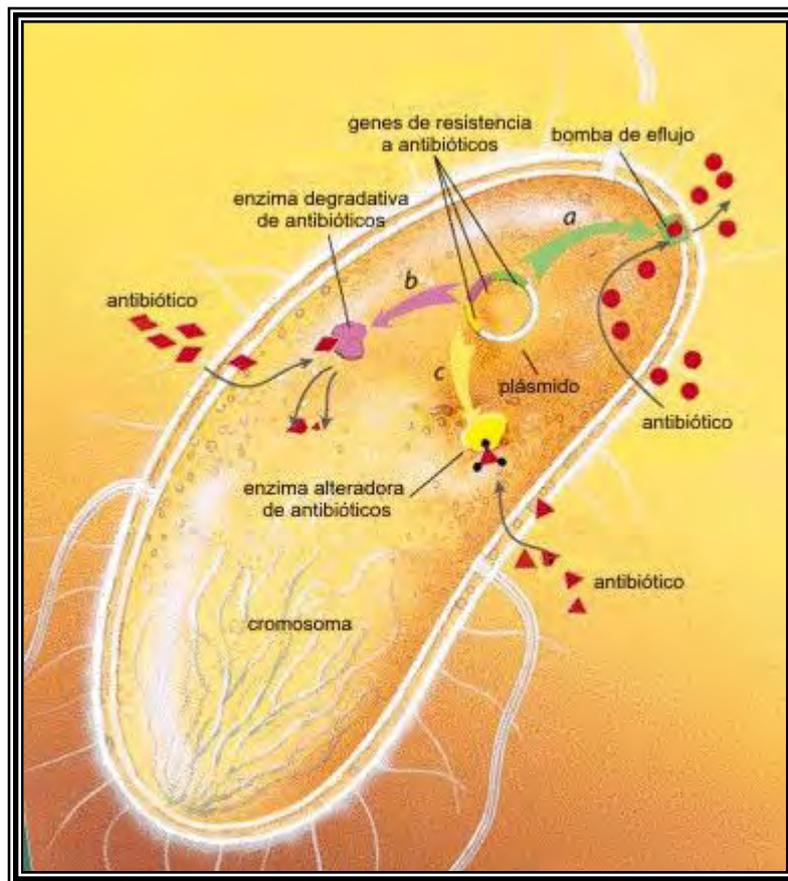
#### **4.3.5.- DESARROLLO DE VÍAS METABÓLICAS ALTERNATIVAS.**

Este mecanismo de resistencia se produce en mutantes auxótrofos que dependen del aporte de substratos para la síntesis de productos que normalmente se obtienen a través de vías metabólicas en las que participan las enzimas que inhiben los antibióticos. Por ello, el microorganismo es capaz de crecer a pesar de la inhibición enzimática ejercida por el antibiótico. Un ejemplo clásico es la resistencia a trimetoprim en bacterias dependientes de timina. Los microorganismos son capaces de sintetizar timidilato por el aporte externo



de timina por una vía biosintética en la que actúa una timidina fosforilasa y una timidina cinasa que produce timidina, en vez de acudir a la vía habitual, que se encuentra bloqueada por la acción del trimetoprim.<sup>32,33</sup>

**Figura No. 2.-** Mecanismos de resistencia bacterianos a antibióticos: a) Alteración en la permeabilidad de la membrana, b) Modificación enzimática, c) Modificación de la diana de acción.



Tomado (34)

## 5.- BACTERIAS MULTIRRESISTENTES.

En la actualidad existen una gran cantidad de bacterias que presentan multirresistencia a antibióticos, no solamente en el área intrahospitalaria sino también a nivel comunitario, lo que sin duda alguna es de gran importancia ya que desde hace muchos años esto ha generado gran cantidad de fallecimientos tras largos y costosos tratamiento con antimicrobianos, que no solo ocasionan pérdidas económicas como se ha mencionando con anterioridad.



Muchas bacterias son causantes de importantes y letales padecimientos para el ser humano pero principalmente por el hecho de presentar gran resistencia a antibióticos podemos señalar a tres de ellas:

### **5.1.- *Staphylococcus aureus*.**

Actualmente *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente (MRSA) es reconocido como uno de los más importantes patógenos causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo; el surgimiento y la diseminación de cepas cada vez más virulentas y multirresistentes hace necesario hacer una revisión del tema.<sup>4</sup>

La elevada virulencia de este patógeno fue notificada por primera vez en un estudio publicado en 1941, en donde se identificó 82% de mortalidad asociada a pacientes con bacteremias ocasionadas por este microorganismo en un hospital de la ciudad de Boston. La incidencia de las infecciones causadas por esta bacteria pueden resumirse de la siguiente manera: frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados y portadores del microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa. Desde estos sitios, se puede transmitir a otras regiones en la piel o a las membranas mucosas; si estas barreras son interrumpidas por un trauma o una cirugía, *Staphylococcus aureus*, que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico.<sup>4</sup>

#### **5.1.1.- FACTORES DE VIRULENCIA.**

El éxito de la colonización y la producción de enfermedades por *Staphylococcus aureus* se debe a la expresión de factores de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del huésped.<sup>4</sup>



Los factores de virulencia se clasifican en tres categorías:

- a.- Factores involucrados en la adherencia de la célula huésped o matriz extracelular, proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.<sup>4</sup>
  
- b.- Factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), SEA-SEE, SEG-J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO; la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares, tipos 1, 5 y 8.<sup>4</sup>
  
- c.- Factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos,  $\alpha$  toxina,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  hemolisinas.<sup>4</sup>

### **5.1.2.- EPIDEMIOLOGÍA.**

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *Staphylococcus aureus* varían entre 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%). Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. Un hospital pediátrico de tercer nivel en México, registró un franco predominio de este relacionado con bacteremias nosocomiales. Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara-México, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia de 8.3 a 36% en esas infecciones, tanto este como diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron la misma prevalencia. <sup>4</sup>

### **5.1.3.- INCIDENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.**

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* abatió de manera importante las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, para 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos de estafilococos fueron resistentes a penicilina, y para mediados de 1950, los aislamientos mostraron niveles más



elevados de resistencia. Los primeros aislamientos clínicos multiresistentes fueron recobrados en 1957, y a principios de 1960 los *Staphylococcus* habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles.<sup>4</sup>

La meticilina es un derivado semisintético de la penicilina. Esta droga fue introducida en Europa en 1959, y un año después se detectó la primera cepa de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente; más tarde, en 1963, se reportó el primer brote nosocomial causado por SAMR; desde entonces se han notificado cepas de SAMR en todo el mundo.<sup>4</sup>

La gran mayoría de los SAMR no sólo son resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, sino también a múltiples antibióticos. Estos patrones de resistencia limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones del SAMR.<sup>4</sup>

En México existe un número limitado de estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en SAMR. En 1993, en el Hospital General de León, Guanajuato, se identificó una resistencia global a meticilina de 24.1 %. Asimismo, en el Hospital Civil de Guadalajara, se obtuvieron resultados que indicaron un incremento en la resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* de 7%, en 1989, a 20%, en 1998. Un estudio llevado a cabo entre 1998 y 1999 en un hospital de tercer nivel en México registró una frecuencia de resistencia de *Staphylococcus aureus* de 14.2%.<sup>4</sup>

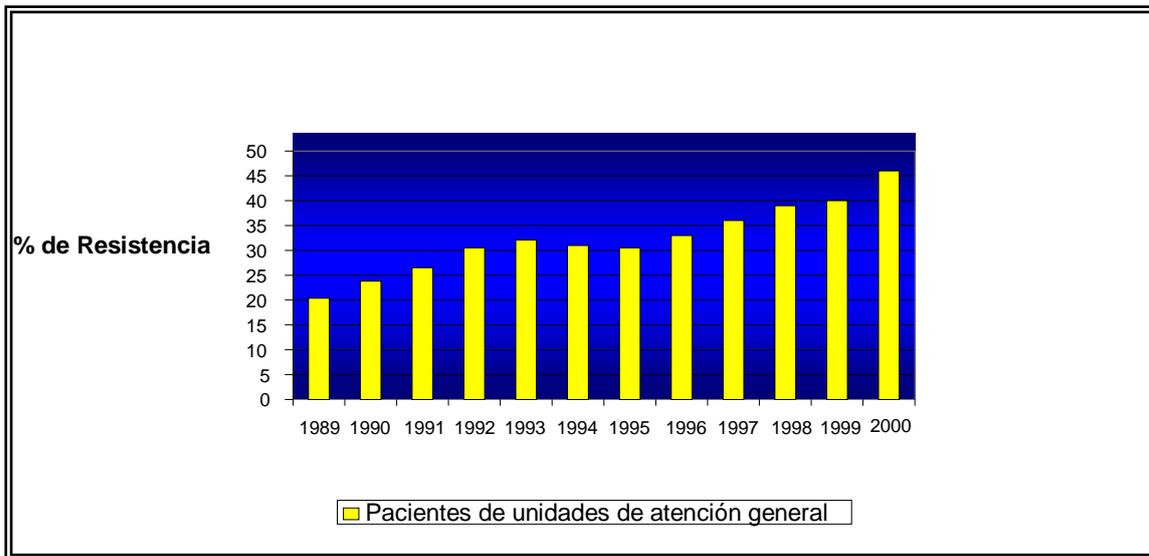
**Tabla No. 1.-*Staphylococcus aureus*: Porcentaje de resistencia, 2004.**

| Nº  | PEN |   | CLI |   | CIP |    | VAN |   | RIF |   | SXT |   | OXA |    | GEN |    | CHL |   | TCY |   | ERI |   | MNO |   |  |
|-----|-----|---|-----|---|-----|----|-----|---|-----|---|-----|---|-----|----|-----|----|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|--|
|     | I   | R | I   | R | I   | R  | I   | R | I   | R | I   | R | I   | R  | I   | R  | I   | R | I   | R | I   | R | I   | R |  |
| 497 |     |   |     |   | -   | 22 | -   | - |     |   | -   | 8 | 4   | 52 | -   | 12 |     |   |     |   |     |   |     |   |  |

Porcentaje de *Staphylococcus aureus* resistente a Penicilina (PEN); Clindamicina (CLI); Ciprofloxacina(CIP);Vancomicina(VAN);Rifampicina (RIF); Trimetoprima+sulfametoxazol (SXT); Oxacilina (OXA); Gentamicina (GEN); Cloranfenicol (CHL); Tetraciclina (TCY); Eritromicina (ERI); Minociclina (MNO). Microorganismos de origen hospitalario. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos, Organización Panamericana de la Salud -2004-, Brasilia, Brasil 27 al 29 de julio, 2005.

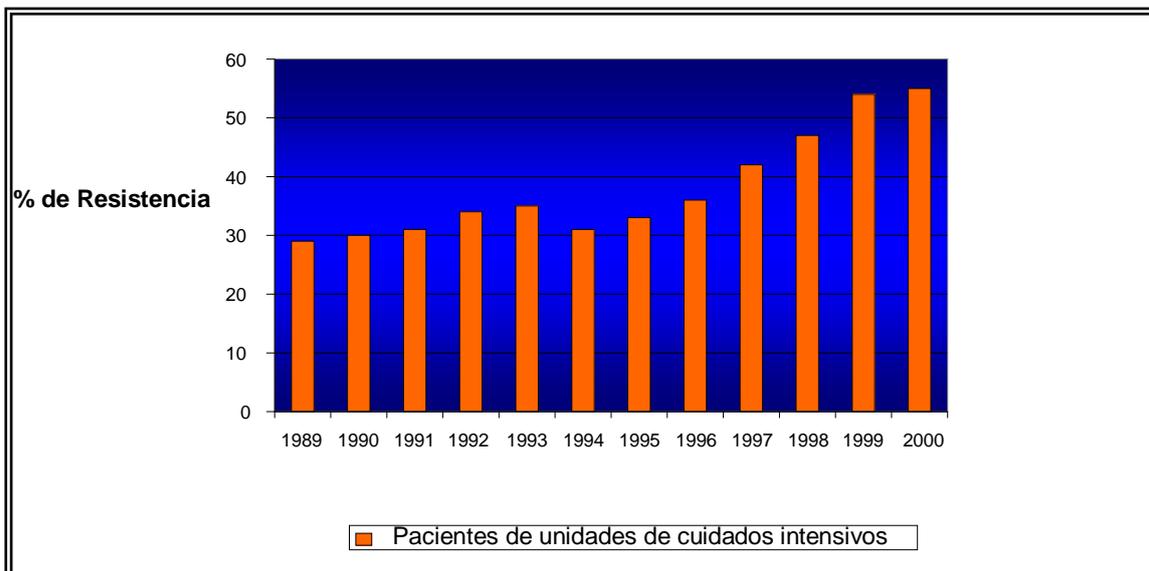


**Gráfico No. 1.- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (oxacilina) en pacientes de UAG.\***



La resistencia de *Staphylococcus aureus* en pacientes de atención general. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

**Gráfico No. 2.- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (oxacilina) en pacientes de UCI.\***



Actualmente, más de 50% de los aislados de *Staphylococcus aureus* causantes de infecciones en unidades de cuidados intensivos son resistentes a la meticilina; en otras unidades del hospital esa resistencia pasa de 40%. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

\* Información disponible del CDC (Centers for Disease Control and Prevention).



#### **5.1.4.- TRATAMIENTO.**

Aunque en los últimos años se ha documentado, en Japón y en Estados Unidos, el hallazgo de cepas SARM con sensibilidad reducida a la vancomicina, este antibiótico, con quien se tiene una mayor experiencia clínica, y la teicoplanina, constituyen en la actualidad los fármacos de primera elección en el tratamiento de las infecciones causadas por cepas SARM. La teicoplanina posee una vida media más larga y puede administrarse por vía intramuscular, sin requerir control de dosis; también presenta menos efectos secundarios.<sup>8</sup>

Se ha tratado de combinar la vancomicina con la rifampicina, ácido fusídico o fosfomicina, aunque en los ensayos clínicos aleatorios no se ha demostrado la ventaja de dichas combinaciones sobre la vancomicina sola. Estos antibióticos no deben prescribirse solos porque seleccionan mutantes resistentes, pero pueden ser útiles cuando se combinan con la vancomicina para el tratamiento de las infecciones óseas, articulares, endocarditis o meningitis, gracias a su mayor distribución tisular.<sup>8</sup>

Las cepas SARM son, a menudo, resistentes a los aminoglucósidos, quinolonas, clindamicina y macrólidos. Además, no siempre la demostración de sensibilidad *in vitro* frente a estos antimicrobianos lleva aparejados buenos resultados terapéuticos. La asociación de vancomicina con gentamicina, si la cepa SARM es sensible a ésta, podría emplearse en casos de endocarditis infecciosa sobre prótesis valvulares.<sup>8</sup>

Algunas nuevas fluoroquinolonas, como el trovafloxacin y el DU-6859<sup>a</sup>, estreptograminas como la RP-59500 (quinupristina-dalfopristina), oxazolidinonas como el linezolid, y los derivados carbapenémicos con elevada afinidad por la PBP2a, como el L-695,256 son nuevos agentes antibacterianos con potente actividad frente a los SARM, pendientes de validar mediante ensayos clínicos.<sup>8</sup>

#### **5.2.- *Pseudomonas aeruginosa*.**

*Pseudomonas aeruginosa* es un organismo bacteriano patógeno, con prevalencia nosocomial, en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México ha ocupado el tercer sitio en frecuencia dentro de los aislamientos intrahospitalarios en los últimos cinco años.<sup>5</sup> Es causa común de neumonía, infección del tracto urinario, infección de heridas quirúrgicas y bacteremia en pacientes hospitalizados.



La infección por *Pseudomonas aeruginosa* se asocia a una estancia prolongada en la unidad de cuidados intensivos, aumenta en la duración de ventilación mecánica, en comparación con otros agentes bacterianos.<sup>10</sup>

En las unidades de cuidados intensivos es frecuente en casos de bacteremias y de neumonías, particularmente en los pacientes intubados, en quienes, además, suele ser multiresistente e incrementa la mortalidad asociada.<sup>5</sup>

Los brotes por *Pseudomonas aeruginosa* en cirugía limpia son inusuales, al igual que la transmisión de este microorganismo por personal colonizado; más aún, no se ha descrito antes en una unidad ambulatoria de cuidados postquirúrgicos de heridas.<sup>5</sup>

### **5.2.1.- FACTORES DE VIRULENCIA.**

Tiene muchos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas; sin embargo, es difícil definir el papel que cada factor desempeña en la enfermedad, y la mayoría de los expertos en este campo creen que su virulencia es multifactorial.<sup>3</sup>

Los factores de virulencia presentes son:

- Cápsula.- Exopolisacárido mucoide; adhesina; inhibe la acción bactericida de los antibióticos (aminoglucósidos); suprime la actividad de los neutrófilos y de los linfocitos.<sup>3</sup>
- Pili .- Adhesina.<sup>3</sup>
- Lipopolisacárido (LPS).- Actividad endotoxina.<sup>3</sup>
- Pilocianina.- Altera la función ciliar; incrementa la liberación de IL-8, la cual estimula la respuesta inflamatoria media en el daño tisular con la producción de radicales de oxígeno tóxicos (p. ej., peróxido de hidrógeno, superóxido, radicales hidroxilo).<sup>3</sup>
- Exotoxina A.- Inhibidor de la síntesis de proteínas; produce daño tisular (p. ej., piel, córnea); inmunosupresor.<sup>3</sup>
- Exotoxina S.- Inhibidor de la síntesis de proteínas; inmunosupresor.<sup>3</sup>
- Citotoxina (leucocidina).- Citotóxica para las membranas eucariotas (p. ej., altera la función leucocitaria, produce lesiones en el lecho microvascular del pulmón).<sup>3</sup>



- Elastasa.- Destrucción de los tejidos que contienen elastina (p. ej., vasos sanguíneos, tejido pulmonar, piel), colágeno, inmunoglobulinas y factores del complemento.<sup>3</sup>
- Proteasa alcalina.- Destrucción tisular; Inactivación del interferón y del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .<sup>3</sup>
- Fosfolipasa C.- Hemolisina termolábil; media en el daño tisular; estimula la respuesta inflamatoria.<sup>3</sup>
- Ramnolípido.- Hemolisina termoestable; altera los tejidos que contienen lecitina; inhibe la actividad ciliar del pulmón.<sup>3</sup>

### **5.2.2.- EPIDEMIOLOGÍA.**

Los brotes por *Pseudomonas* representan 5% de las infecciones nosocomiales. Esta bacteria se ha asociado con la contaminación de fuentes comunes como agua, antisépticos y equipo médico, como broncoscopios.<sup>5</sup>

La mortalidad que ocasiona es aproximadamente de 40-50%. Existe un incremento en la prevalencia de neumonía en la comunidad con origen de *Pseudomonas aeruginosa* en los últimos años, en especial en pacientes con una lesión estructural previa de la vía aérea (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística o bronquiectasias). El conocimiento de la epidemiología de esta bacteria en los servicios de hospitalización puede favorecer un mejor control de las infecciones por dicho agente.<sup>10</sup>

### **5.2.3.- INCIDENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.**

A través de los años su frecuencia de resistencia se ha incrementado, con más del 30% para antibióticos con actividad antipseudomona; incluso es crítica la resistencia a los carbapenemos. *Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno con más alta prevalencia de resistencia a los antimicrobianos actuales, sobre todo en América Latina y aunque existen reportes en México de resistencia semejante, es muy alta en relación con la reportada en Inglaterra e Irlanda, incluso de algunos de sus hospitales de enseñanza. Nuevas carbapenemasas, que tienen resistencia a carbapenemos, se describen en *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales son mediados por plásmidos y convendría determinar su existencia en el hospital.<sup>11</sup>



Aunque en algunas series no se ha observado un aumento en la resistencia antimicrobiana, en los últimos años, la mayoría de los estudios sí lo han comunicado. Esto se ha observado, de forma muy llamativa, con ciprofloxacino que ha pasado de un 1% de resistencia en 1986 a casi un 40% en estudios recientes.<sup>12</sup>

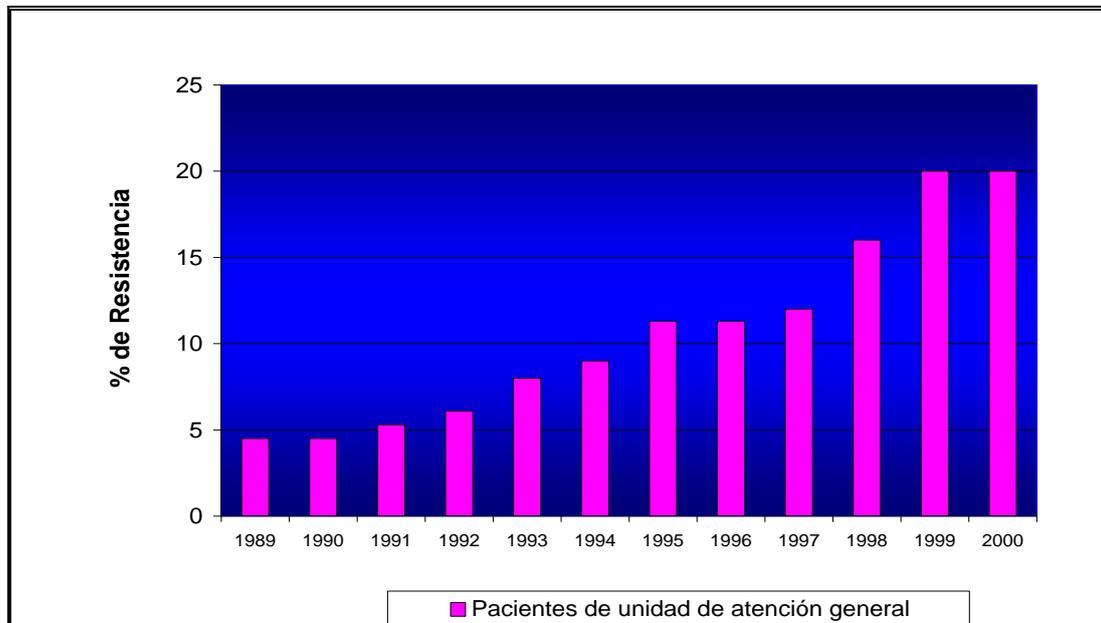
**Tabla No 2.- Pseudomonas aeruginosa; porcentaje de resistencia, 2004.**

| Nº | GEN |    | TZP |    | CIP |    | CAZ |    | IPM |    | MEM |   | AMK |    | FEP |    | CFP |   | ATM |   | PIP |   |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|----|-----|----|-----|---|-----|---|-----|---|
|    | I   | R  | I   | R  | I   | R  | I   | R  | I   | R  | I   | R | I   | R  | I   | R  | I   | R | I   | R | I   | R |
| 89 | 6   | 29 | 2   | 22 | 2   | 23 | 3   | 31 | 3   | 20 |     |   | 3   | 27 | 4   | 16 |     |   |     |   |     |   |

Porcentaje de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Penicilina (PEN); Clindamicina (CLI); Ciprofloxacina (CIP); Vancomicina (VAN); Rifampicina (RIF); Trimetoprima+sulfametoxazol (SXT); Oxacilina (OXA); Gentamicina (GEN); Cloranfenicol (CHL); Tetraciclina (TCY); Eritromicina (ERI); Minociclina (MNO). Microorganismos de origen hospitalario. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos, Organización Panamericana de la Salud -2004-, Brasilia, Brasil 27 al 29 de julio, 2005.

**Gráfico No. 3.- Pseudomonas aeruginosa resistente a Fluoroquinolonas en pacientes de UAG.\***

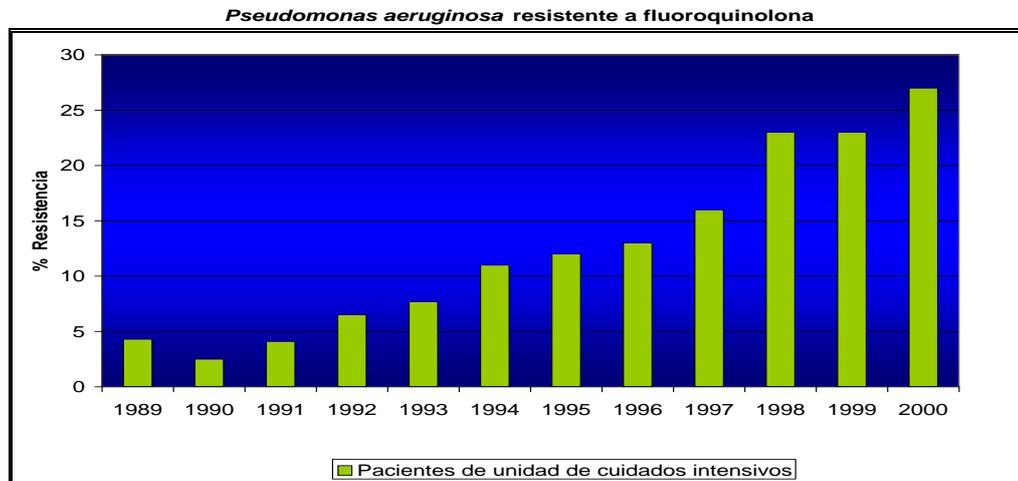
**Pseudomonas aeruginosa resistente a Fluoroquinolona**



Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes de unidades de atención general. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).



**Gráfico No. 4.-** *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Fluoroquinolonas en pacientes de UCI.\*



Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes de unidades de cuidados intensivos. También comienza a surgir resistencia a las fluoroquinolonas, fenómeno atribuible al mayor uso de esta clase de medicamentos en la década pasada . National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

\* Información disponible del CDC ( Centers for Disease Control and Prevention).

#### **5.2.4.- TRATAMIENTO.**

En general se recomienda un tratamiento combinado con un betalactámico y un aminoglucósido. Si el paciente ha recibido previamente aminoglucósidos se recomienda sustituirlos por ciprofloxacino o amikacina. No existen estudios que hayan comparado la monoterapia frente a la combinación de estos agentes entre sí. En monoterapia se han utilizado tres fármacos: ceftazidima, imipenem-cilastatina y ciprofloxacino. Como profilaxis no son útiles ni la descontaminación selectiva del tubo digestivo ni la inmunización activa.<sup>12</sup>

Dada la existencia de cepas multirresistentes es importante el estudio de sinergia en asociaciones de antimicrobianos como posibles alternativas en el tratamiento de estas infecciones.<sup>12</sup>



### **5.3.- *Klebsiella pneumoniae*.**

Es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos. En México existen algunos reportes que muestran a *K. pneumoniae* como uno de los principales organismos causantes de infecciones intrahospitalarias, que causan niveles significativos de morbilidad y mortalidad.<sup>6,13</sup>

#### **5.3.1.- FACTORES DE VIRULENCIA.**

Los principales factores de virulencia asociados a *Klebsiella pneumoniae* son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, los sideróforos y el lipopolisacárido. Todos ellos tienen una gran importancia y la patogenicidad de la bacteria es resultado de la acción conjunta de varios de estos factores, que permitirán a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior del huésped, resistir su sistema inmune (o simplemente no estimularlo) y producirle un daño.<sup>14</sup>

- Polisacáridos capsulares (CPSs).- Esta cápsula es una estructura superficial formada por exopolisacáridos complejos que han permitido clasificar a *Klebsiella* en 77 serotipos según el antígeno capsular (K) que presentan. El material capsular forma envolturas gruesas que recubren la superficie bacteriana, protegiendo a la célula de la opsonofagocitosis y de la actividad bactericida del suero.<sup>14</sup>
- Pilis (Fimbrias).- La habilidad de la bacteria para adherirse y colonizar las superficies mucosas del organismo huésped es una etapa crítica en el desarrollo de la infección. Las propiedades adhesivas en *Klebsiella* son generalmente mediadas por diversos tipos de pilis, que son proyecciones filamentosas no flagelares que se hallan sobre la superficie bacteriana y que están compuestos por subunidades proteicas globulares (pilinas). Estas estructuras filamentosas se extienden desde la superficie bacteriana y permiten la unión a las células eucariotas a través de receptores específicos.<sup>14</sup>
- Sideróforos.- El crecimiento de las bacterias en los tejidos del huésped no sólo está limitado por los mecanismos de defensa de éste, si no también por la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes esenciales para su crecimiento como el hierro.<sup>14</sup>



- El lipopolisacárido (LPS).- Es una molécula glucolipídica anclada en la cara externa de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas que consiste en una porción polisacáridica unida covalentemente al lípido A. La parte polisacáridica consta de dos regiones, el núcleo del lipopolisacárido y la cadena lateral O ó antígeno O. En *K. pneumoniae* se han descrito once estructuras diferentes en su antígeno O que pueden ser diferenciadas por métodos inmunológicos, aunque algunas similitudes estructurales reducen reactividad cruzada de forma que el número actual de serotipos diferentes es de nueve: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12.<sup>14</sup>

### **5.3.2.- EPIDEMIOLOGIA.**

La gran mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas con la hospitalización, aunque en los continentes asiático y africano persisten como importantes causantes de diversas enfermedades adquiridas en la comunidad. Como patógenos oportunistas que son, *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos que se hallan hospitalizados y padecen severas enfermedades subyacentes, como pueden ser la diabetes mellitus o la obstrucción pulmonar crónica.

Las infecciones nosocomiales por este patógeno, están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *Klebsiella pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías y es el segundo agente causal, tras *Escherichia coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas.

### **5.3.3.- INCIDENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.**

El porcentaje de individuos portadores de *Klebsiella* aumenta radicalmente en el ambiente hospitalario y la colonización en el paciente se asocia significativamente con la utilización de antibióticos. Las terapias antimicrobianas, además, han sido a menudo responsables de la emergencia de cepas de *Klebsiella* resistentes a múltiples antibióticos en hospitales, lo cual ha generado un renovado interés en el estudio de esta como agente infeccioso.



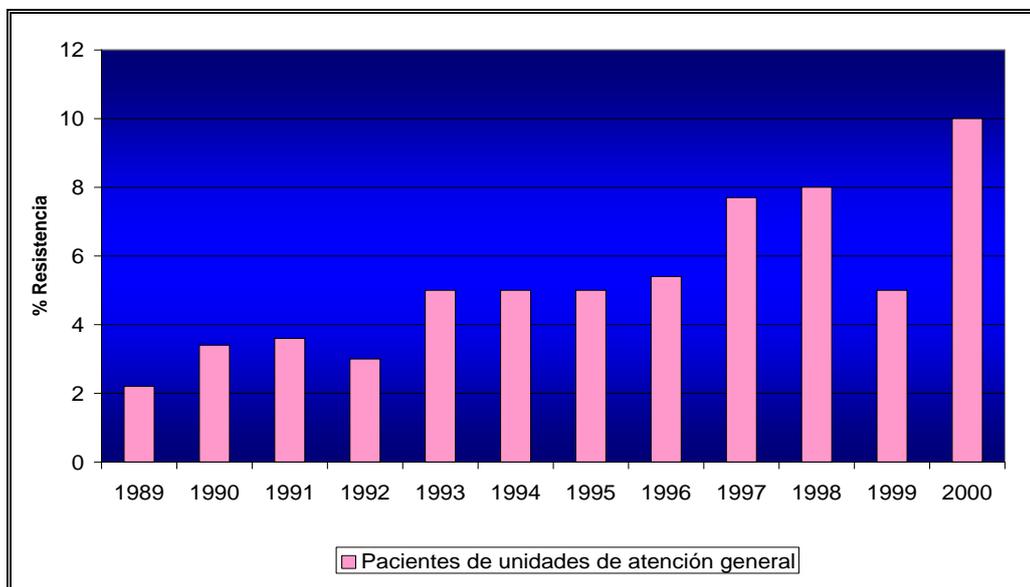
En los años setenta las cepas multirresistentes lo eran a aminoglicósidos (gentamicina, estreptomina, etc) principalmente, pero a partir de los años ochenta comenzaron a detectarse también 5 cepas productoras del β-lactamasas de amplio espectro, lo cual les confería resistencia a las cefalosporinas incluso de tercera generación (como la cefotaxima).

Tabla No. 3.- *Klebsiella pneumoniae*; porcentaje de resistencia 2004.

| Nº             | GEN |     | AMK |     | CIP |    | CEP |   | CTX |     | SXT |     | IPM |   | MEM |   | SAM |   | NIT |   |  |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|--|
|                | I   | R   | I   | R   | I   | R  | I   | R | I   | R   | I   | R   | I   | R | I   | R | I   | R | I   | R |  |
| 83             | 2   | 40  | 3   | 36  | 4   | 11 |     |   |     |     | 3   | 31  | -   | - |     |   |     |   |     |   |  |
| 1 <sup>1</sup> | -   | 1/1 | -   | 1/1 | -   | -  |     |   | -   | 1/1 | -   | 1/1 | -   | - | -   | - | -   | - | 1/1 |   |  |
| Hemocultivo    |     |     |     |     |     |    |     |   |     |     |     |     |     |   |     |   |     |   |     |   |  |

Penicilina (PEN); Clindamicina (CLI); Ciprofloxacina (CIP); Vancomicina (VAN); Rifampicina (RIF); Trimetoprima+sulfametoxazol (SXT); Oxacilina (OXA); Gentamicina (GEN); Cloranfenicol (CHL); Tetraciclina (TCY); Eritromicina (ERI); Minociclina (MNO). Microorganismos de origen hospitalario. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos, Organización Panamericana de la Salud -2004-, Brasilia, Brasil 27 al 29 de julio, 2005.

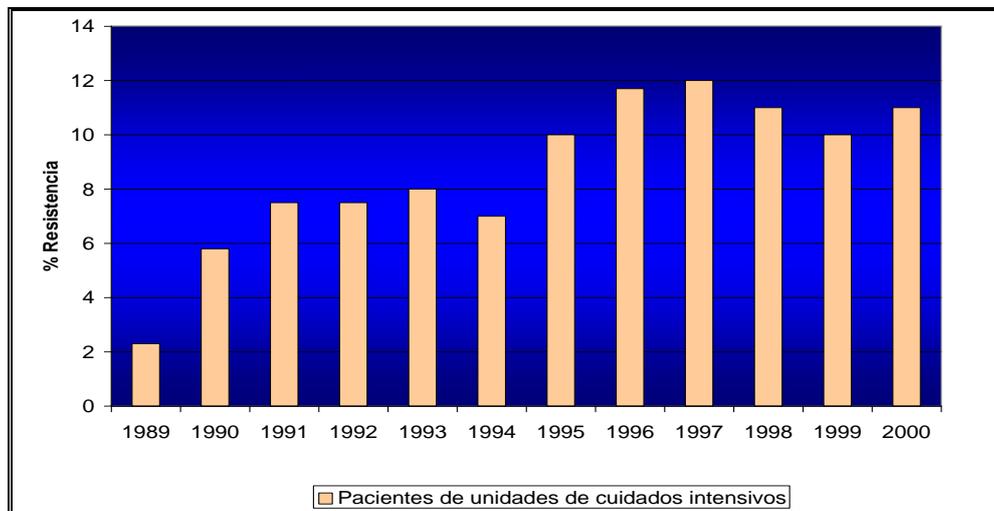
Gráfico No. 5.- *Klebsiella pneumoniae* resistente a Cefalosporinas de 3ª generación en pacientes de UAG.



Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* en pacientes de unidades de cuidados intensivos. El problema de la resistencia a los antimicrobianos incluye también a los microorganismos gramnegativo. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).



**Gráfico No. 6.-** *Klebsiella pneumoniae* resistente a Cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación en pacientes de UCI.\*



Cepas de *Klebsiella* y muchas otras Enterobacteriaceae han adquirido beta-lactamasas de espectro extendido que confieren resistencia a las cefalosporinas. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

\* Información disponible del CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

### 5.3.5.- TRATAMIENTO.

Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas: Existen recomendaciones varias en cuanto al reporte de susceptibilidad para piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico. Hay comunicaciones de tratamiento exitoso de infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE pero la susceptibilidad *in vivo* puede ser enzima-específica. Así, BLEE derivadas de TEM son más susceptibles a piperacilina/tazobactam que las derivadas de SHV. Su actividad esta influenciada por el efecto inoculo, regímenes de administración del fármaco y el aumento de cepas con mutaciones en porinas. Existe una limitada experiencia clínica para tratamiento de infecciones serias. Estos agentes podrían ser considerados como alternativa terapéutica.<sup>17</sup>

Quinolonas: Alternativas atractiva de tratamiento pero ya se reporta un aumento de asociación entre BLEE y resistencia a quinolonas, que es usualmente cromosomal. Ha sido documentada la resistencia plasmidial con  $\beta$ -lactamasas tipo Amp C, sumado a una alteración en porinas.<sup>17</sup>

Aminoglucósidos: Merece consideraciones similares a quinolonas. Las BLEE no tienen efecto intrínseco en su actividad, pero la resistencia a aminoglucósidos puede co-



transferirse con BLEE a través de plasmidios. Los aminoglucósidos no son una alternativa terapéutica apropiada como monoterapia.<sup>17</sup>

Cefamicinas: Cefamicinas (cefotaxima y cefotetan) son estructuralmente más estables a la hidrólisis por BLEE, muchas bacterias son susceptibles *in vitro*. La información de tratamiento de infecciones graves con cefamicinas es muy limitada y hay reportes de fracaso clínico debidos a la emergencia de resistencia intratratamiento por el desarrollo de mutación en porinas. Se ha observado un aumento de cepas que expresan múltiples  $\beta$ -lactamasas Amp C que originan resistencia a este grupo.<sup>17</sup>

Oximino  $\beta$ -lactámicos: El dilema de cefepime. Cefepime es activo contra muchas cepas productoras de BLEE, particularmente de enzimas derivadas de SHV. Sin embargo, la susceptibilidad disminuye con el aumento del inóculo en test de susceptibilidad *in vitro* y en modelos *in vivo*. Este es el llamado *efecto inóculo*: aumento en 8 veces la CIM con mayor inóculo bacteriano; ha sido observado en cefepime y cefotaxima, es menos importante en carbapenems, y de trascendencia intermedia en piperacilina/tazobactam. El resultado clínico es bueno cuando el sitio de infección es urinario. Mantiene mejor actividad que piperacilina/tazobactam (en un análisis farmacocinético/farmacodinámico). Se ha conocido de fallas clínicas en reportes bacteriológicos que lo informaban como sensible (bacteremia por *K. pneumoniae*). No debe indicarse como primera línea en infecciones graves por bacterias productoras de BLEE, y si se usa, la dosis debe ser mayor o igual a 2 grs cada 12 hrs y en combinación con otro agente activo (aminoglucósidos o fluoroquinolonas).<sup>17</sup>

Carbapenems: Representan la terapia de elección en bacterias productoras de BLEE (imipenem-meropenem). Son resistentes a la hidrólisis y tienen excelente actividad *in vitro*. Diversos estudios clínicos avalan su uso; Se han descrito mecanismos de resistencia por carbapenemasas mediadas por plasmidios, metalo  $\beta$ -lactamasas y proteasas de espectro extendido; afortunadamente no son frecuentes. Resistencia debido a alteraciones en las porinas ha sido observada en cepas de *K. pneumoniae*.<sup>17</sup>

Nuevas alternativas terapéuticas: Ertapenem y faropenem tienen excelente actividad contra bacterias productoras de BLEE (*K.pneumoniae*, *E. coli*, etc) y cefalosporinasas Amp C. Tienen la ventaja farmacocinética de una vida media larga que permite indicar una dosis diaria.<sup>17</sup>



## 6.- IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES.

El uso de las plantas medicinales se remonta a inicio de la civilización humana, las grandes culturas como China, Hindú, Griega, Nor-Africana, Azteca cuentan con evidencia sobre el uso de este recurso para aliviar diversos problemas de salud; transmitidos en forma oral del conocimiento, impreso o computarizado.<sup>23</sup>

Las plantas medicinales representan una de las fuentes naturales más importantes de compuestos con diversas actividades farmacológicas; por otro lado y debido al auge que ha tenido el uso de este recurso natural en la actualidad, la OMS estima que el 80% de la población en África, el 48.7% en Australia, el 70% en Canadá, el 42% en Estados Unidos, el 38% en Bélgica y un 75% en Francia utilizan las plantas medicinales para solucionar sus principales necesidades de salud. En los países en vías de desarrollo el gran uso de la Medicina Tradicional se debe al fácil acceso y disposición.<sup>23</sup>

Como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento e identificación y de experimentación farmacológica, se han encontrado nuevas sustancias de origen vegetal con importante actividad biológica, empleándose ahora más como sustancias purificadas que en antiguas preparaciones galénicas. La utilización de compuestos naturales aislados incluyendo fármacos sintéticos no carecen de limitaciones pero en años recientes se ha incrementado el interés por el uso de agentes fitoterapéuticos estrechamente relacionados con los recursos vegetales.<sup>23</sup>

En el planeta existen un total de 250 000 especies de las cuales, cerca del 15% han sido investigadas fitoquímicamente y solo al 6% se le ha explorado su potencial biológico.<sup>23</sup>

Actualmente no se dispone de los datos necesarios para precisar la difusión del uso de las plantas, de los principios activos derivados de estas, en los sistemas de salud de los distintos países del mundo. Los fármacos derivados de plantas presentan gran importancia en países desarrollados como por ejemplo Estados Unidos, Alemania y Japón.<sup>23</sup>

En México, el uso de las plantas es amplio y se tiene registrado en el herbario IMSS aproximadamente 5000 especies botánicas con propiedades medicinales, las cuales son utilizadas por la población en general para tratar diversos padecimientos. La enorme riqueza de la flora medicinal en México se debe a su ubicación geográfica y a la diversidad de grupos étnicos (52 grupos). Actualmente más del 66% hace uso de este recurso natural, en los centros urbanos ha surgido un reencuentro con la naturaleza lo



que ha provocado que a los conocimientos de la medicina moderna, se le agreguen los de la medicina tradicional para obtener diferentes modelos terapéuticos.<sup>23</sup>

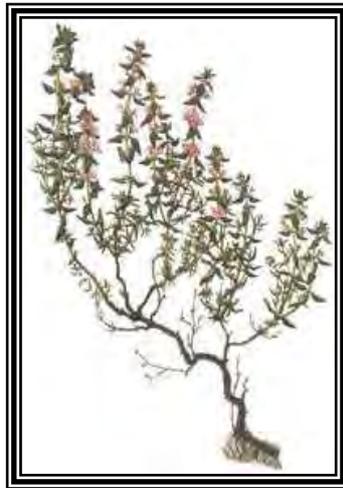
Actualmente, el uso de plantas medicinales tiene gran aceptación en la población, por su fácil disponibilidad, costo y forma de uso, de hecho una de las plantas utilizadas en el tratamiento de infecciones en vías respiratorias e infecciones gastrointestinales es el Tomillo.

## **7.- GENERALIDADES DEL TOMILLO.**

### **7.1.- NOMBRE CIENTÍFICO.**

*Thymus vulgaris*<sup>28</sup>

**Figura No. 3.-** Planta de tomillo.



### **7.2.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.**

Se trata de un subarbusto aromático y perenne, perteneciente a la familia de las Labiadas (Lamiacéas), caracterizado por presentar una altura variable entre 10-40 cm; tallos leñosos tortuosos y grisáceos ; hojas opuestas, verde-grisáceas, enteras , lineares o elípticas, de hasta 15mm de largo, con envés tomentoso; flores pequeñas bilabiadas de color lila o blanco, dispuestas en inflorescencias terminales densas o laxas; que hacen su aparición desde principios de verano hasta finales de otoño. El fruto es un aquenio ovoide liso.<sup>24,28</sup>



## 7.2.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Reino: *Plantae*<sup>54</sup>

Subreino: *Tracheobionta*<sup>54</sup>

División: *Magnoliophyta*<sup>54</sup>

Clase: *Magnoliopsida*<sup>54</sup>

Subclase: *Asteridae*<sup>54</sup>

Orden: *Lamiales*<sup>54</sup>

Familia: *Lamiaceae*<sup>54</sup>

Genero: *Thymus*<sup>54</sup>

Especie: *Thymus vulgaris*<sup>54</sup>

## 7.3.- HÁBITAT.

El Tomillo es originario de la región mediterránea occidental, en especial del sur de Italia, siendo posteriormente distribuido en prácticamente todas las regiones. Crece silvestre en matorrales secos, suelos rocosos pero bien drenados y soleados. Se cultiva extensamente en casi todos los países como planta aromática culinaria.<sup>24,28</sup>

## 7.4.- PARTES UTILIZADAS.

Sumidad florida seca (el tallo con las brácteas y flores). El olor es aromático, intenso y característico, en tanto el sabor también es aromático y ligeramente picante.<sup>24,28</sup>

## 7.5.- HISTORIA.

El uso del tomillo data de tiempos muy antiguos. Los egipcios lo empleaban como una de las sustancias aplicadas en los procesos de momificación. El nombre *Thymus* proviene del griego *Thumus* que significa "fuerza" o "coraje", ya que se empleaba principalmente como infusión energizante y como antiséptico de heridas de los guerreros. Esta nomenclatura fue empleada por Teofrasto para designar tanto al tomillo como la ajedrea. Se cree que la planta que utilizaban los griegos muy probablemente correspondía a la especie *Thymus capitatus* L. Plinio recomendaba como antídoto para las mordeduras de serpientes. El propio Carlomagno (742-814) ordeno su cultivo en todos los jardines para aprovechar tanto sus propiedades medicinales como culinarias.<sup>28</sup>



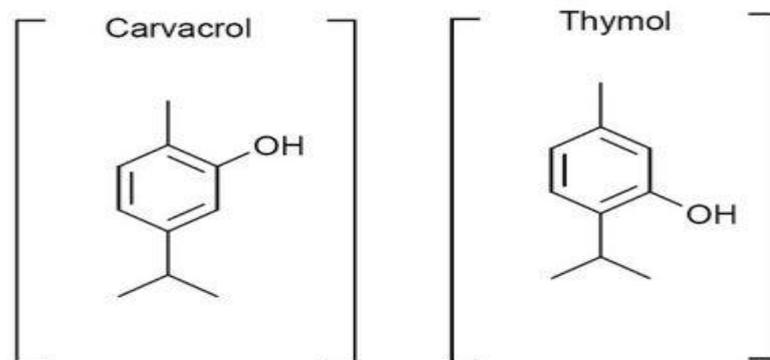
Al parecer, fueron los monjes benedictinos quienes la introdujeron en Europa central siendo muy popular entre los años 850 y 1250, sobre todo en el norte de los Alpes. Para entonces eran muy comunes los baños tonificantes con esencias de tomillo, así como su empleo antiparasitario. En el siglo XVI fue cultivado extensamente en Europa y regiones aledañas al Mediterráneo, formando parte de numerosas recetas y preparados correspondientes a las primeras farmacopeas europeas. Siendo introducida a nuestro país en la época Colonial y distribuida en gran parte de la República Mexicana.<sup>23</sup> En 1725, un botánico Alemán llamado Neumann obtiene el aceite esencial, comenzando a partir de entonces su estudio con fines terapéuticos.<sup>28</sup>

#### 7.6.- COMPOSICIÓN QUÍMICA.

<sup>26,28</sup>Planta rica en aceites esenciales 1-2.5%

- Fenoles terpénicos: principalmente timol (40%) y carvacrol (2.5-14.6%).
- Monoterpenos: en menor cantidad, como el borneol, el geraniol y el p-cimeno.
- Flavonoides: los más importantes son las polimetoxiflavonas, sobre todo las tri- y tetra-metoxiflavonas
- Taninos:7-10%

**Figura No. 4.-** Terpenos fenólicos de Tomillo.





## 7.7.- ACCIONES FARMACOLÓGICAS.

El caso del tomillo es ilustrativo a la hora de especificar su actividad biológica respecto a la especie botánica seleccionada, ya que la composición fitoquímica puede variar enormemente de un ejemplar a otro. Las principales propiedades terapéuticas del tomillo están en relación a la composición fenólica del aceite esencial desarrollando actividad antitusiva, expectorante, antimicrobiana, antioxidante y antiespasmodica.<sup>28</sup>

### 7.7.1.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La esencia de Tomillo, fundamentalmente por sus componentes fenólicos, Timol y Carvacrol, tiene una actividad antibacteriana tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-). Esto es debido a su efecto sobre la membrana bacteriana. La eliminación de Timol y Carvacrol por vía respiratoria produce una actividad antiséptica respiratoria. Por su actividad antimicrobiana el Tomillo tiene interés también como antiséptico urinario y de la cavidad bucofaringea así como para el lavado de heridas. Además el Timol y el Carvacrol tienen una acción antimicótica, efectiva frente a *Candida albicans*.<sup>29</sup>

Por otra parte el extracto acuoso de Tomillo inhibe de forma significativa, *in Vitro*, el crecimiento del *Helicobacter pylori* y su potente actividad ureasa.<sup>29</sup> Dentro de la actividad antimicrobiana, el timol y carvacrol han demostrado exhibir el mayor espectro terapéutico comparativamente con el resto de los componentes del aceite esencial (Litvinenko V. et al., 1975; Olechnowicz S. et al., 1975; Pellecuer J., 1993; Dorman I-I. & Deans S., 2000). Investigadores de la Universidad de Montpellier (Francia) han identificado entre seis y siete quimiotipos diferentes en ejemplares de tomillo europeos (Passet J., 1979). En estudios de actividad antibacteriana se ha visto, que el quimiotipo 5 es el menos activo en función de la MIC (concentración inhibitoria mínima) en las cepas bacterianas, mientras que el quimiotipo 1 presenta la mayor actividad antifúngica.<sup>28</sup>

Frente a *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* también resultó activo *in Vitro* el extracto acuoso de las hojas de tomillo (Cáceres A. et al., 1991). En cambio, frente a *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* la actividad de los extractos acuoso y etánolico ha resultado débil (Díaz R. et al., 1988). Otros ensayos *in Vitro* realizados con el aceite esencial corroboraron su actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, al mismo tiempo que ejercieron actividad inhibitoria frente a *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureuginosa*, *Streptococcus pneumoniae*,



*Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *C. diphtheriae* (Allegrini J. et al. 1972; Ramonaelina A. et al., 1987; Safirev S. et al., 1997; Essawi T & Srour 2000; Behillvan J. et al., 2002; Jt.:gl M. et al., 2002).<sup>28</sup>

El aceite esencial también demostró inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes in Vitro* al bloquear la actividad de la enzima listeriolisina O. Al respecto, redujo a 52,1 HU/ml las unidades hemolíticas, respecto al control de 99,8 HU/ml (Smith Palmer A. et al., 2002), A nivel micótico, el aceite esencial ha demostrado efecto fungistático frente a *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum* con una CIM de 25 ppm (Perrucci S. et al., 1994).<sup>28</sup>

Tanto el extracto acuoso como cetónico de tomillo han desarrollado actividad inhibitoria in vitro frente a *Micobacterium tuberculosis* (Lall N. & Meyer J., 1999). Otros hongos que han demostrado sensibilidad frente al aceite esencial de tomillo son: *Candida albicans*, *Criptococcus neoformans*, *Saprolegnia sp.*, y *Zygorhynchus sp.* (Vollon C. et al., 1994; Perrucci S. et al., 1995). Un reciente estudio demostró el efecto inhibitorio in Vitro (CIM = 0,62 mg/ ml) del extracto metanólico de tomillo frente a *Candida albicans* clotrimazol-resistente (Shahidi Bonjar G., 2003).<sup>28</sup>

En casos de candidiasis vaginal, algunos autores han sugerido la aplicación de óvulos con aceite esencial de tomillo (50 mg/ óvulo de glicerogelatina de 5 g) a razón de un óvulo por noche durante 20 días (Vanaclocha B.& Cañigüeral S., 2003). Frente a hongos fitopatógenos, el aceite esencial de tomillo demostró inhibición in Vitro frente a *Alternaria tenui*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium sp.*, *Lentinus lapideus* y *Lenzites trabea* (Grainge M. & Ahmed S., 1988; Homes Belmnt R., 1998; Soliman & Badeaa IZ., 2002).<sup>28</sup>

El timol del aceite esencial ha demostrado ser un efectivo antihelmíntico, en especial frente a ancilostomas, áscaris y oxiuros (Budavari S., 1989; Peris J. et al., 1995). El aceite esencial de tomillo ha demostrado in Vitro disminuir significativamente la viabilidad de las formas parasitarias sanguíneas de *Tripanosoma brucie* y sobre promastigotes de *Leishmania major* (Mikus J. et al, 2000). Por otra parte, el aceite esencial ha demostrado actividad insecticida frente al tercer estadio larvario de *Lucilia sericata* , con una CL<sub>50</sub>=130 ppm (Morsy T. et al, 1998). Frente al gusano *Spodopteralitura*, invasor de las plantaciones de tabaco, los compuestos timol y carvacrol una significativa actividad insecticida en el tercer estadio larvario (Isman M. et al., 2001).<sup>28</sup>



### **7.7.2.- OTROS.**

En ensayos inmunológicos, tanto la administración del extracto metanólico como la fracción insaponificable de la planta entera de tomillo, administrados en dosis de 0,5 ml/ratón por vía intraperitoneal, no han demostrado promover mecanismos de fagocitosis (Delaveau P. et al., 1980). En estudios realizados en niños con enuresis, el aceite de tomillo administrado por vía oral ha evidenciado su efectividad en varios casos (Martindale, 1982). La administración a ratas por medio de intubación gástrica, del extracto etanólico (95%) de la planta entera, en dosis de 500 mg/kg, evidenció propiedades antipiréticas en un modelo de fiebre inducido por inyección de levadura de cerveza (Al Yahya M. et al., 1985).<sup>28</sup>

Estudios realizados en conejos con el aceite esencial administrado por vía oral o intramuscular, arrojaron una acción hipotensora arterial acompañada de taquicardia. Cuando la dosis fue incrementada, se observó estimulación respiratoria. Lo mismo aconteció en gatos por vía intravenosa, aunque no se observó taquicardia (Leung A. & Foster S., 1996). La actividad hipotensora en ratas pudo ser observada también tras la administración de extractos alcohólicos de una especie muy emparentada (*Thymus orospedanus*) actuando por medio de un efecto antagonista frente a adrenalina. En la actividad hipotensora podría incidir además, la acción diurética de los flavonoides (Jiménez J. et al., 1988). Finalmente, el timol presente en las hojas de tomillo ha demostrado un efecto inhibitor de la agregación plaquetaria bajo inducción por trombina, colágeno, ADP y ácido araquidónico (Okazaki K. et al., 2002).<sup>28</sup>

### **7.8.- EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS.**

Estudios en Animales - In Vitro: El aceite esencial en altas dosis ha demostrado ser neurotóxico por vía interna y cáustico a nivel dérmico. Tanto el limoneno, como el pineno y el linalol serían responsables de esta última actividad, de acuerdo a lo observado en conejos y ratas. Si bien la piel humana es mucho más resistente a estas sustancias, igualmente se aconseja aplicar cremas o pomadas que contengan sustancias acarreadoras o diluyentes para dichos componentes (Leung A. & Foster S., 1996).<sup>28</sup>

La administración del extracto etanólico (40%) de las partes aéreas desecadas en dosis de 1,6 ml/kg por vía oral a conejas y ratas gestantes, no resultó embriotóxico ni teratogénico. Tampoco demostró inhibir la ovulación ni la fertilidad de ratas hembras adultas. Su suministro durante 13 semanas consecutivas a ambos grupos de animales, no



produjo cambios en los parámetros sanguíneos o urinarios. Así mismo no se observaron lesiones anátomo-patológicas en los órganos internos luego de efectuadas las autopsias (Leslie G. & Salmon G., 1979).<sup>28</sup>

La DL<sub>50</sub> para el aceite esencial de tomillo por vía oral en ratas asciende a 4.7g/kg y por vía dérmica a 5g/kg (Opdyke D, 1974). La DL<sub>50</sub> del extracto etanólico (30%) en ratones por vía oral fue estimado en 34 ml/kg (Leslie G., 1978). La DL<sub>50</sub> del timol por vía oral en ratas asciende a 980 mg/kg, en tanto la del carvacrol en conejos (por la misma vía) fue estimada en 100 mg/kg (Budavari S., 1989). El aceite esencial no ha resultado mutagénico en las pruebas sobre *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* (Azizan A. & Blevins R., 1995).<sup>28</sup>

Diferentes extractos de tomillo resultaron antimutagénicos al igual que el componente luteolina, el cual demostró una fuerte actividad antimutagénica frente a carcinógenos alimentarios (Natake M. et al., 1989; Samejima K. et al., 1995). Un estudio de toxicidad efectuado en rata demostró la inocuidad del suministro en la dieta diaria de un 2% a 10% de hojas de tomillo, no registrándose daños histopatológicos ni alteraciones en los parámetros sanguíneos ni ponderales (Haroun E. et al., 2002).<sup>28</sup>

Estudios en Humanos: Los extractos muy ricos en timol administrados por vía oral, pueden provocar náuseas, vómitos; dolor gástrico, diarreas, cefalea. hipotermia, debilidad muscular, confusión mental y colapso cardio-respiratorio; en cambio, los muy ricos en carvacrol (sustancia también irritante) tendrían menor potencia tóxica (Pellecuer J., 1995). El timol se encuentra dentro de la formulación de algunas pastas dentales, observándose en sus usuarios algunos casos de queilitis y glositis (Leslie G. & Salmon G., 1979). A nivel dérmico, se han denunciado episodios de dermatitis de contacto en granjeros que habrían aspirado polvo durante el proceso de secado del tomillo (Spiewak et al., 2001).<sup>28</sup>

Si bien el timol es 25 veces más potente que el fenol, su uso en forma aislada queda muy limitado, debido a su baja solubilidad en agua, su poder irritante sobre mucosas (gástrica y urinaria) y su susceptibilidad a las proteínas. En tal sentido, se recomienda no emplear esta especie en dosis mayores a 15 g/toma ni durante más de 30 días consecutivos (Germosén Robineau L., 1996; Robbers J. et al., 1997; Brinker F., 1998). Debido a la toxicidad del timol se dejó de emplear como antiparasitario (uncinariasis y teruasis) en humanos, aunque aún se lo sigue utilizando con estos fines en medicina veterinaria (Robbers J. et al., 1997).<sup>28</sup>



## **7.9.- CONTRAINDICACIONES.**

El aceite esencial no debe ser empleado durante el curso de úlceras gastroduodenales y debe emplearse con precaución durante el embarazo y lactancia (Blumenthal M. et al., 2000). Tampoco se recomienda en niños menores de dos años, ni en casos de hipertiroidismo, de acuerdo a lo observado experimentalmente en ratas (el mecanismo no está bien dilucidado). (Newall C. et al., 1996; Leung A. & Foster S., 1998). El timol no debe suministrarse en casos de enterocolitis, insuficiencia cardiaca y durante el embarazo (Vanaclocha B. & Cañigüeral S., 2003).<sup>28</sup>

## **7.10.- INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.**

El extracto etéreo de hojas de tomillo, en dosis de 200 mg/kg vía intraperitoneal a ratones, demostró potenciar los efectos de barbitúricos administrados previamente (Han Y. et al., 1984).<sup>28</sup>

## **1.- STATUS LEGAL.**

La sumidad florida del tomillo se encuentra en varias Farmacopeas: Argentina, Alemania (10<sup>th</sup> Ed.), Austria (ÖAB, 1981-3), ESCOP (Fascículo 1, 1997), España, Francia, Gran Bretaña (FHB, 1983), Holanda, Hungría, Italia, Noruega, Polonia, Rep. Checa, Rumania, Suecia, Suiza (7<sup>th</sup> Ed., 1987), ex- Yugoslavia (sólo las hojas), etc. Debido a sus diferentes quimiotipos, la Farmacopea Francesa exige para la esencia un contenido mínimo en fenoles totales del 30%, conformados principalmente por timol y carvacrol (Bezanger Beauguesne L. et al., 1980).<sup>28</sup>

La Farmacopea Argentina exige para la esencia un tenor no menor al 20%, ni mayor al 45% de fenoles (timol y carvacrol). La farmacopea Española exige que la droga contenga no menos de 0.5% de aceite esencial calculado como timol (Cañigüeral S. et al., 1998). El tomillo se encuentra aprobado como suplemento alimenticio por la FDA norteamericana, estando registrada la planta entera en categoría GRAS (Mc Caleb R., 1993). A su vez, se encuentra aprobado por la Comisión E de Monografías de Alemania para el abordaje de cuadros respiratorios (Blumenthal M. et al., 2000). La planta entera figura también, entre las hierbas aprobadas para uso humano por los Ministerios de Sanidad de Bolivia, Costa Rica y Venezuela (Garda González M., 2000).<sup>28</sup>



## JUSTIFICACIÓN

Tras el descubrimiento y aplicación clínica de los agentes antibacterianos, la morbilidad y la mortalidad causadas por infecciones bacterianas se redujo considerablemente. Hoy, sin embargo, la salud pública se enfrenta a un nuevo desafío debido al alarmante aumento de la resistencia bacteriana a la mayoría de los agentes antibacterianos.

Por esta razón la finalidad del proyecto es buscar una alternativa para el tratamiento de algunas de las bacterias resistentes causantes de infecciones comunes, la cual consiste en el empleo de productos de origen natural, ya que durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal ó incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus conocimientos en el empleo de los productos que de ellas se extraen. De las cuales se han encontrado mayores ventajas de uso que desventajas.

## HIPÓTESIS

Si determinamos la eficacia del extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* entonces podremos dar una alternativa al tratamiento contra este tipo de bacterias multiresistentes.



## O B J E T I V O      G E N E R A L

Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de *Thymus vulgaris* con *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## O B J E T I V O S      P A R T I C U L A R E S

- Determinar por medio de una prueba cualitativa si el extracto de *Thymus vulgaris* posee actividad antibacterial.
- Realizar análisis de sensibilidad del extracto de *Thymus vulgaris* con *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* por medio de dilución en microplaca y la técnica de Mosmann.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del extracto de *Thymus vulgaris* en *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Identificar el efecto que ejerce el extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión.



## METODOLOGIA

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para llevar a cabo la experimentación en su mayoría fueron suministrados por el laboratorio No. 10 de la unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como la obtención del extracto de *Thymus vulgaris* por donación de "EXTRACTOS SIGMA", además de el uso de equipo de los laboratorios de Microscopía Electrónica y de Inmunología.

Las cepas bacterianas fueron obtenidas del Cepario del laboratorio No 10 de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

### 1.- MATERIAL

#### 1.1.- MATERIAL DE LABORATORIO

- Recristalizador (PYREX)
- Frasco ámbar con tapón de rosca estéril de 15ml
- Espátula de acero inoxidable
- Membrana de 0.45 $\mu$ m (MILLIPORE)
- Membrana de 0.22 $\mu$ m (MILLIPORE)
- Frascos ámbar con tapón de rosca estéril de 5L
- Papel filtro (WHATMAN de No. 41)
- Embudo
- Microplaca de 96 pozos estéril (KLIMBE GLASS inc.)
- 6 tubos de ensaye con tapón de rosca estériles de 5ml (KIMAX)
- Pipetas graduadas estériles de 2ml (KIMAX)
- Pipetas graduadas estériles de 5ml (KIMAX)
- Micropipeta de 100 $\mu$ l (SAMPLER SYSTEM)
- Puntas estériles para micropipeta
- 5 cajas petri
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Gradilla
- Matraz Erlenmeyer de 250ml (PYREX)
- Papel aluminio
- Embudo



## 1.2.- EQUIPO

- Estufa bacteriológica (RIOSSA)
- Campana de flujo laminar horizontal (VELO)
- Parrilla eléctrica (NOVA II)
- Espectrofotometro (FLX800)
- Horno Pasteur (RIOSSA)
- Vortex ( SCIENTIFIC INDUSTRIES)
- Equipo para filtración de líquidos (MILLIPORE)
- Microscopio Electrónico de Transmisión

## 1.3.- MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ( Cepa proveniente de aislamiento clínico)
- Cepa de *Pseudomonas aureuginosa* ( Cepa proveniente de aislamiento clínico)
- Cepa de *Klebsiella pneumoniae* ( Cepa proveniente de aislamiento clínico)
- Cepa de *Salmonella typhi* ( Cepa proveniente de aislamiento clínico)

## 1.4.- REACTIVOS

- Agua destilada estéril.
- Caldo BHI a doble concentración estéril.
- Cloruro de sodio.
- MTT.
- Extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (5L)(SIGMA)
- Agar BHI estéril.
- Agar nutritivo.

## 2.- MÉTODO

### 2.1.- EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Thymus vulgaris*.

Este fue donado por EXTRACTOS SIGMA, ubicada en Av. 20 de Noviembre 221, col. Ejido del Socorro Cuautitlan Izcalli, México C.P. 54740; quienes proporcionaron 5L de extracto de *Thymus vulgaris* distribuidos en envases de 1L c/u.

Los ensayos realizados por EXTRACTOS SIGMA, para verificar la calidad del extracto se encuentran en el Apéndice C de este trabajo.



## **2.2.- ESTERILIZACIÓN DE EXTRACTO.**

1.- Cada litro de extracto fue filtrado a través de un papel filtro de poro mediano (WHATMAN).

2.- Después de haber realizado una primera filtración para la eliminación de partículas suspendidas se realizó una segunda filtración con el equipo de filtración (MILLIPORE) utilizando membrana estéril de 0.45 $\mu$ m, dentro de una campana de flujo laminar horizontal (VELO), recibiendo el filtrado en un frasco ámbar de 5L esterilizado en autoclave (121°/15min).

3.- Se llevo a cabo una segunda filtración con membrana estéril de 0.22 $\mu$ m, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el punto anterior.

Una vez terminado el proceso de esterilización del extracto se realizó una prueba para confirmar su esterilidad:

1.- En una caja petri con Agar BHI o Agar nutritivo se colocaron 100 $\mu$ l del extracto, por medio de una micropipeta con punta estéril (todo esto bajo condiciones de esterilidad).

2.- Una vez depositado el volumen se esparció en el medio con un asa bacteriológica estéril y se incubó a 37°C por 24 horas.

3.- Transcurrida la incubación no se observó ningún tipo de crecimiento.

Confirmada la esterilidad del extracto se procede a la cristalización.

## **2.3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO.**

1.- Se vertió todo el contenido del frasco ámbar en un cristizador estéril (PIREX), bajo condiciones de esterilidad.

2.- El cristizador con el extracto se introdujo en el Horno Pasteur (RIOSSA) y se dejó evaporar el etanol a una temperatura no mayor de 40° C por 24 horas.

3.- Formados los cristales se recolectaron con ayuda de una espátula estéril y contenidos en frascos viales estériles.



#### **2.4.- PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK.**

- 1.- En condiciones de esterilidad se pesó 1g de cristales de *Thymus vulgaris* y se vertieron en un frasco ámbar estéril de 15ml.
- 2.- Posteriormente se le añadió 1ml de DMSO y se llevó a un aforo de 10ml con agua destilada estéril para disolver los cristales, obteniendo una concentración de 100mg/ml.

#### **2.5.- PRUEBA CUALITATIVA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL EXTRACTO.**

- 1.- En una placa con agar nutritivo se inoculó *Staphylococcus aureus* (cepa de 24 horas de crecimiento), reparando un inóculo de concentración igual al 0.5 del Nefelómetro, por medio de un sembrado masivo.
- 2.- Se incubó por 5 minutos y se añadieron con ayuda de una micropipeta y punta estéril 100µl del extracto.
- 3.- Se incubó a 37°C por 24 horas.
- 4.- Transcurrido el tiempo se observa la placa, para verificar si el extracto posee actividad antibacterial.

#### **2.6.- PREPARACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.**

La verificación y tipificación de las bacterias utilizadas en este procedimiento se llevo a cabo por medio del uso de medios selectivos y pruebas bioquímicas. (Ver Apéndice A)

Para la preparación de las suspensiones bacterianas se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Tipificadas las bacterias se sembraron en placas con Agar nutritivo las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* por 24 horas a 37°C.
- 2.- En tubos de ensaye de 5ml con caldo BHI a doble concentración estéril, se ajustaron a 0.5 de la escala de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml); esto en condiciones de esterilidad.



## 2.7.- ENSAYO EN MICROPLACA.

La microplaca posee 96 pozos con columnas del 1 al 9 donde cada columna corresponde a una dilución y columnas 10 a 12 donde se probaron los controles y blancos; las filas de la A a la H, corresponden a los ensayos de las bacterias por duplicado.

1.- Se colocaron en los pozos de la columna 2 a la 9 en las 8 filas 100 $\mu$ l de SSF Estéril, con la micropipeta y puntas estériles, utilizando para cada fila un tubo diferente.

2.- En los pozos de la columna 1 en las 8 filas se colocan 100 $\mu$ l del extracto concentrado.

3.- A partir de los pozos de la columna 2 y hasta la 9 realizar diluciones dobles del extracto obteniendo un volumen final de 100 $\mu$ l por pozo. (Los 100 $\mu$ l restantes en el pozo 9 se desechan).

4.- De los inóculos preparados se le adicionan 100 $\mu$ l de estos a los pozos de las columnas 1 a 9 , realizando dos ensayos por cada una de las bacterias, es decir las filas A y B correspondieron a *Staphylococcus aureus*, C y D a *Pseudomonas aeruginosa*, E y F a *Salmonella typhi* y G y H a *Klebsiella pneumoniae*.

5.- En la columna de pozos numero 10 correspondieron a un Control Positivo el cual contiene 100 $\mu$ l de SSF Estéril y 100 $\mu$ l de la bacteria a probar correspondiente a cada fila.

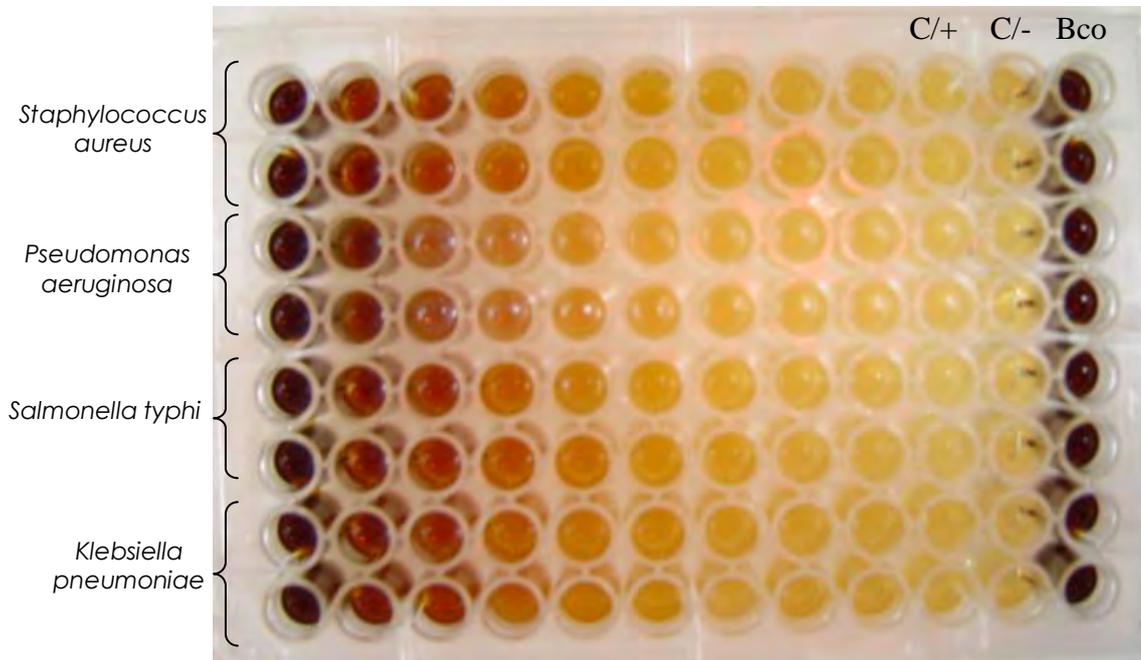
6.- La columna de pozos numero 11 corresponde a un Control Negativo el cual contiene 100 $\mu$ l de SSF Estéril y 100 $\mu$ l de Caldo BHI a doble concentración estéril.

7.- La columna de pozos numero 12 correspondieron a un Blanco el cual contenía 100 $\mu$ l del extracto estéril a probar y 100 $\mu$ l de Caldo BHI a doble concentración estéril.

8.- Terminado el llenado de los pozos se colocó en una estufa bacteriológica a una temperatura de 36-37 °C durante 24 horas.



**Figura No. 5.-** Bioensayos en micropalcas.



## **2.8.- LECTURA DEL ENSAYO EN MICROPLACA.**

- 1.- Después de las 24 horas de incubación se observa la micropalca y se realizan lecturas visuales.
- 2.- Se debe de observar ausencia de turbidez en las columnas de pozos que son Control Negativos y Blancos, mientras que en la columna que corresponde al Control Positivo debe de presentar turbidez abundante.
- 3.- Se comparan los pozos problema con los controles y el blanco determinando si presentan turbidez o no. Si existe la presencia de turbidez y entre más se asemejen al Control Positivo indican un crecimiento de la bacteria por lo cual el crecimiento de esta no se inhibe por el extracto que se esta probando. Los pozos que no presentan turbidez y entre más se asemejan al Control Negativo indican que no existe un crecimiento de la bacteria por lo cual el extracto sí presenta un efecto inhibitorio al crecimiento del microorganismo.



### **2.9.- ENSAYO BACTERICIDA / BACTERIOSTÁTICO.**

1.- En una placa con agar BHI se realizan divisiones por la parte externa de la placa, cada división correspondió a un pozo del ensayo.

2.- Se tomó con un asa bacteriológica estéril de cada pozo un inóculo y se realiza un estriado en el espacio correspondiente.

3.- Se incubaron a 37°C por 24 horas.

4.- Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las placas, en los estriados que no presentaron crecimiento se denotó una actividad bactericida del extracto, pero en los estriados del inóculo donde sí observó crecimiento en placa, con ausencia de actividad metabólica, la actividad del extracto es denotada como bacteriostática.

### **2.10.- TÉCNICA DE MOSMANN (REACTIVO MTT).**

Este método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por *Mosmann* en 1983 siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot y Rita Langa*.<sup>31</sup>

1.- Se adicionaron a todos los pozos de la microplaca 5µl de reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) el cual presenta un color amarillo sino hay presencia de bacterias viables en el pozo, mientras que en los pozos donde las bacterias son viables el MTT vira a color violeta/morado. Esta técnica permite observar y determinar fácilmente cuales pozos de la microplaca presentan crecimiento y en cuales pozos el extracto ha inhibido la actividad de la bacteria, permitiendo determinar la MIC.



## 2.11.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Para poder conocer más acerca de la acción antibacterial del extracto se tomaron microfotografías de las bacterias seleccionadas para este ensayo con el extracto al igual que de las bacterias solas para poder realizar comparativos y de esa forma determinar si en realidad ejerce algún efecto y tratar de comprender la acción que ejerce el extracto en las bacterias.

Para la obtención de las fotografías se realizaron las preparaciones de las muestras como se indica:

- 1.- Obtención de las bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*), con un tiempo de incubación no mayor a 24 horas.
- 2.- Preparación de 40 ml de caldo BHI a doble concentración estéril.
- 3.- Numerar tubos estériles 1, 2 y 3 con capacidad de 10 ml (Para cada bacteria). El tubo número 1 corresponde a la muestra problema y el tubo número 2 al control positivo y el tubo número 3 al control negativo.
- 4.- En el tubo número 1 se colocaron 2.5 ml de SSF estéril, más 2.5 ml de caldo BHI a doble concentración estéril, previamente inoculado con la bacteria problema al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.
- 5.- En el tubo número 2 se adicionaron 5.0 ml de caldo BHI doble concentración con bacteria estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.
- 6.- El tubo número 3 se preparo con 5 ml del extracto de *Thymus vulgaris*.
- 7.- Se incubaron los tres tubos a 37°C/24 h, en la estufa bacteriológica.
- 8.- Transcurrido el tiempo de incubación, se realizo a los tres tubos centrifugaciones a 2000rpm/10 min. Empleando para los lavados SSF estéril, desechando el sobrenadante (hasta observar el sobrenadante claro).
- 9.- Posteriormente se adiciono a cada tubo, 3 ml del reactivo de Karnovsky, dejando reposar durante una hora; para posteriormente centrifugar a 2000 rpm/30 min.



10.- Para finalizar se elimino el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 3 ml de Buffer de fosfatos.

11.- La muestra se ajusto a  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml, igualando para ello al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.

### **2.11.1.- PREPARACIÓN DE LAS REJILLAS CON MEMBRANAS DE PARLODIÓN AMILO.**

1.-Las rejillas se deben lavar con acetona y esperar a que sequen.

2.- Se preparo el parlodión amilo 2.5 % de parlodion en acetato de amilo.

3.- Llenar un vaso de precipitado con capacidad de un 1Lt, con agua destilada (Baño María).

4.- Se impregno un portaobjetos con Parlodión amilo, y se dejo reposar hasta observar la película seca (con un grosor de 70-100 $\mu$ m).

5.- Posteriormente se cortaron las cuatro orillas del portaobjetos, se sumergió en el baño María, poco a poco hasta que se logro separar la película plástica.

6.- Las rejillas fueron colocadas sobre la membrana y posteriormente recogidas con papel filtro.

### **2.11.2.- TÉCNICA DE TINCIÓN NEGATIVA.**

1.- Se coloco una gota de suspensión bacteriana sobre un papel parafilm, y encima de ésta se colocaron 2 rejillas con membrana para que se adsorbiera la muestra durante un tiempo aproximado de 20 minutos.

2.- Se tomaron las rejillas y el exceso se fue retirado con papel filtro.

3.- Las rejillas fueron lavadas con SSF y el exceso de agua, se elimino con papel filtro.

4.- Posteriormente se llevo a cabo la tinción de las rejillas con ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH = 7.2), durante 1 minuto.



- 5.- Se lavaron las rejillas para eliminar el exceso de colorante con SSF estéril y dejaron secar en estufa a 35 °C/20 min.
- 6.- Una vez seca la rejilla se observó en el Microscopio Electrónico de Transmisión.
- 7.- Se tomaron fotografías para observar la morfología bacteriana.



## R E S U L T A D O S

### 1.- RESULTADOS DE LA PRUEBA CUALITATIVA PARA LA DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO.

Para comprobar que el extracto de *Thymus vulgaris* posee actividad antibacterial, se desarrolló una prueba cualitativa, en la cual transcurrido el tiempo de incubación se observa una notable inhibición en el crecimiento, aproximadamente más del 85%.

**Figura No. 6.**-Inhibición de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* tras la incubación con extracto de tomillo.





## 2.- RESULTADOS DE BIOENSAYO DEL EXTRACTO DE *Thymus vulgaris* CON LA BACTERIA *Staphylococcus aureus*.

Se realizaron bioensayos en microplacas, donde visualmente se nota la inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus*, de la concentración de 100000µg/ml hasta la concentración de 12500µg/ml, una vez agregando en reactivo MTT, y produciéndose las coloraciones correspondientes se llevo acabo la lectura en el espectrofotómetro, obteniéndose las absorbancias reportadas en la siguiente tabla.

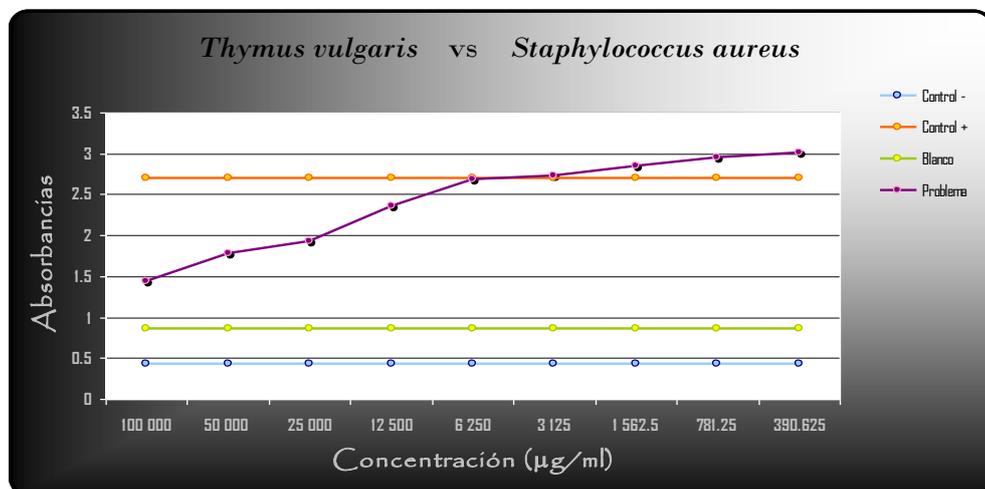
**Tabla No 4.-** Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de *Thymus vulgaris* con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

| Pozo | Problema (Abs) | [µg/ml] |
|------|----------------|---------|
| 1    | 1.4326         | 100 000 |
| 2    | 1.7865         | 50 000  |
| 3    | 1.9321         | 25 000  |
| 4    | 2.354          | 12 500  |
| 5    | 2.6897         | 6 250   |
| 6    | 2.7263         | 3 125   |
| 7    | 2.8475         | 1 562.5 |
| 8    | 2.9548         | 781.25  |
| 9    | 3.0125         | 390.625 |

|       | Absorbancia |
|-------|-------------|
| C / - | 0.4303      |
| C / + | 2.6984      |
| Bco   | 0.8546      |

**Grafico No. 7.-** Efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* a diferentes concentraciones con *Staphylococcus aureus*.





### 3.- RESULTADOS DE BIOENSAYO DEL EXTRACTO DE *Thymus vulgaris* CON LA BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa*.

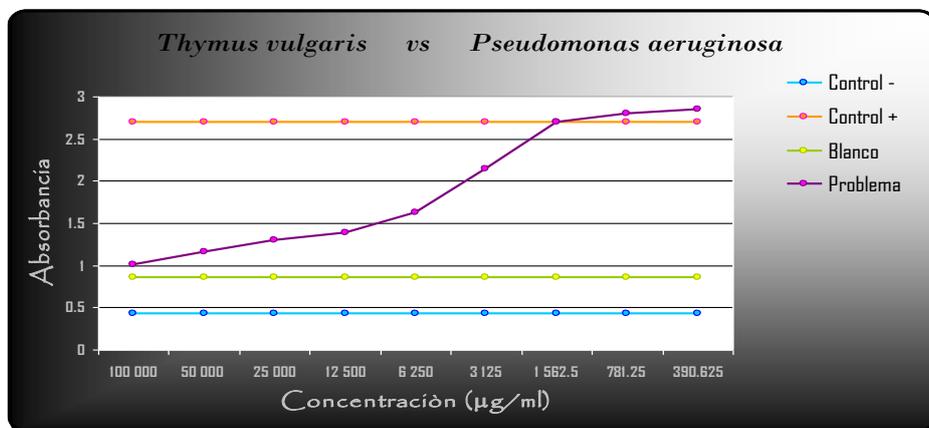
*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria de importancia medica debido a que presenta una gran incidencia en infecciones de origen nosocomial además de ser portadora de gran cantidad de plásmidos de resistencia a antibacteriales, es por esta razón que el hecho de que presente sensibilidad a este extracto es muy importante, los resultados de las absorbancias obtenidas en el bioensayo de microplaca evidenciado por la técnica de Mosmann nos denota sensibilidad de la bacteria que va de 100000µg/ml a 3125µg/ml.

**Tabla No. 5.-** Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de *Thymus vulgaris* con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

| Pozo | Problema (Abs) | [µg/ml] |
|------|----------------|---------|
| 1    | 1.0096         | 100 000 |
| 2    | 1.1539         | 50 000  |
| 3    | 1.3033         | 25 000  |
| 4    | 1.3807         | 12 500  |
| 5    | 1.6218         | 6 250   |
| 6    | 2.1430         | 3 125   |
| 7    | 2.6954         | 1 562.5 |
| 8    | 2.8041         | 781.25  |
| 9    | 2.8514         | 390.625 |

|       | Absorbancia |
|-------|-------------|
| C / - | 0.4303      |
| C / + | 2.6984      |
| Bco   | 0.8546      |

**Grafico No. 8.-** Efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* a diferentes concentraciones con *Pseudomonas aeruginosa*.





**4.- RESULTADOS DE BIOENSAYO DEL EXTRACTO DE *Thymus vulgaris* CON LA BACTERIA *Klebsiella pneumoniae*.**

Tras la lectura en el espectrofotómetro se determino que la bacteria *Klebsiella pneumoniae* presenta una MIC de 1562.5 µg/ml.

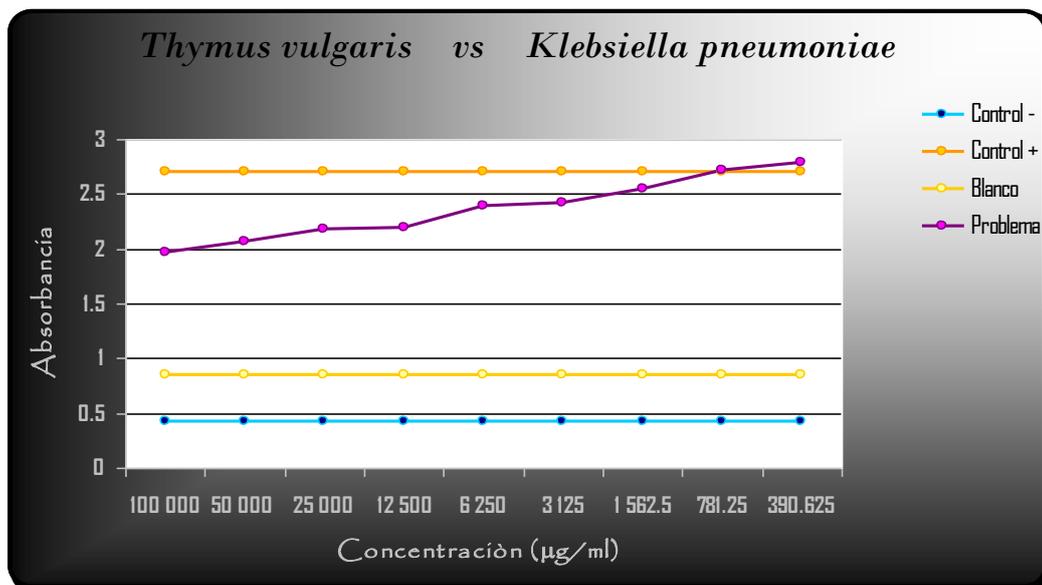
**Tabla No. 6.-** Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de *Thymus vulgaris* con la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

| Pozo | Problema | [µg/ml] |
|------|----------|---------|
| 1    | 1.9634   | 100 000 |
| 2    | 2.0657   | 50 000  |
| 3    | 2.1803   | 25 000  |
| 4    | 2.194    | 12 500  |
| 5    | 2.3845   | 6 250   |
| 6    | 2.4213   | 3 125   |
| 7    | 2.5483   | 1 562.5 |
| 8    | 2.7101   | 781.25  |
| 9    | 2.7852   | 390.625 |

|       | Absorbancia |
|-------|-------------|
| C / - | 0.4303      |
| C / + | 2.6984      |
| Bco   | 0.8546      |

**Grafico No. 9.-** Efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* a diferentes concentraciones con *Klebsiella pneumoniae*.





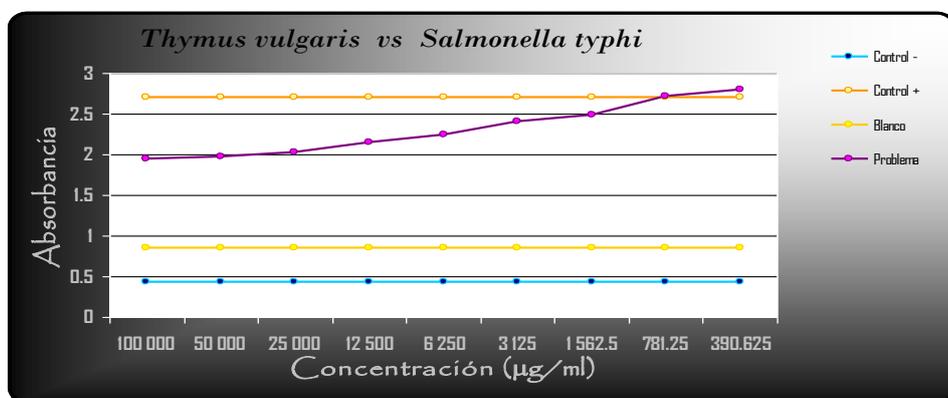
### 5.- RESULTADO DE BIOENSAYO DEL EXTRACTO DE *Thymus vulgaris* CON LA BACTERIA *Salmonella typhi*.

*Salmonella typhi* es una importante bacteria, por la incidencia que posee a nivel mundial en infecciones, el bioensayo realizado con esta bacteria, es de forma comparativa con respecto a bacterias que presentan de forma muy elevada resistencia a antibióticos. Con las absorbancias se observa que *Salmonella typhi* presenta sensibilidad al extracto de *Thymus vulgaris* ya que en la mayoría de los pozos no presenta absorbancias iguales o mayores al control positivo, lo que indica que la bacteria fue incapaz de desarrollarse como normalmente lo hace en un medio enriquecido.

**Tabla No. 7.-** Datos obtenidos del Bioensayo en microplaca por el método de Mosmann del extracto de *Thymus vulgaris* con la bacteria *Salmonella typhi*.

| Pozo  | Problema | [ $\mu\text{g/ml}$ ] | Absorbancia  |       |        |       |        |     |        |
|-------|----------|----------------------|--|-------|--------|-------|--------|-----|--------|
| 1     | 1.9488   | 100 000              | <table border="1"> <tr><td>C / -</td><td>0.4303</td></tr> <tr><td>C / +</td><td>2.6984</td></tr> <tr><td>Bco</td><td>0.8546</td></tr> </table> | C / - | 0.4303 | C / + | 2.6984 | Bco | 0.8546 |
| C / - | 0.4303   |                      |  |       |        |       |        |     |        |
| C / + | 2.6984   |                      |  |       |        |       |        |     |        |
| Bco   | 0.8546   |                      |  |       |        |       |        |     |        |
| 2     | 1.9672   | 50 000               |  |       |        |       |        |     |        |
| 3     | 2.0315   | 25 000               |  |       |        |       |        |     |        |
| 4     | 2.1546   | 12 500               |  |       |        |       |        |     |        |
| 5     | 2.248    | 6 250                |  |       |        |       |        |     |        |
| 6     | 2.4004   | 3 125                |  |       |        |       |        |     |        |
| 7     | 2.4842   | 1 562.5              |  |       |        |       |        |     |        |
| 8     | 2.7194   | 781.25               |  |       |        |       |        |     |        |
| 9     | 2.8011   | 390.625              |  |       |        |       |        |     |        |

**Gráfico No. 10.-** Efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* a diferentes concentraciones con *Salmonella typhi*.





## 6.- RESULTADOS DE LA PRUEBA BACTERICIDA / BACTERIOSTÁTICO

Esta es una prueba cualitativa que nos ayudó a determinar el tipo de efecto que tiene el extracto sobre la bacteria, para determinar si a las concentraciones de prueba fue capaz de eliminar completamente a la bacteria o solo inhibió su crecimiento durante su exposición.



**Figura No. 7.-** Efecto bacteriostático en *Staphylococcus aureus*



**Figura No. 8.-** Efecto bacteriostático en *Pseudomonas aeruginosa*



**Figura No. 9.-** Efecto bacteriostático en *Klebsiella pneumoniae*



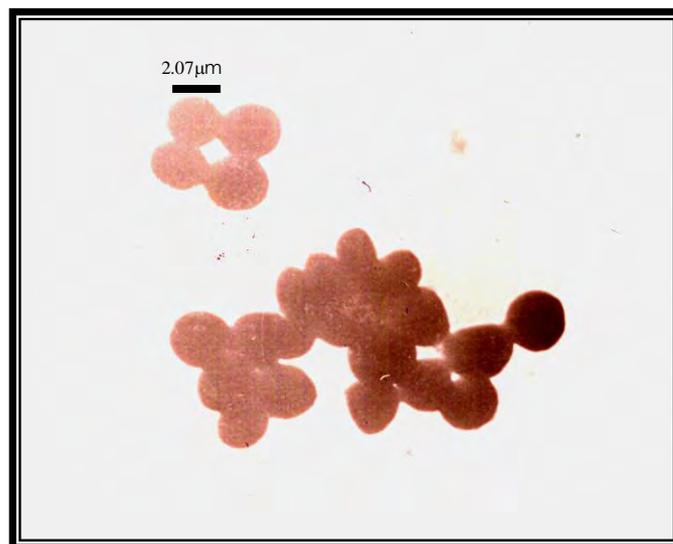
**Figura No. 10.-** Efecto bacteriostático en *Salmonella typhi*.



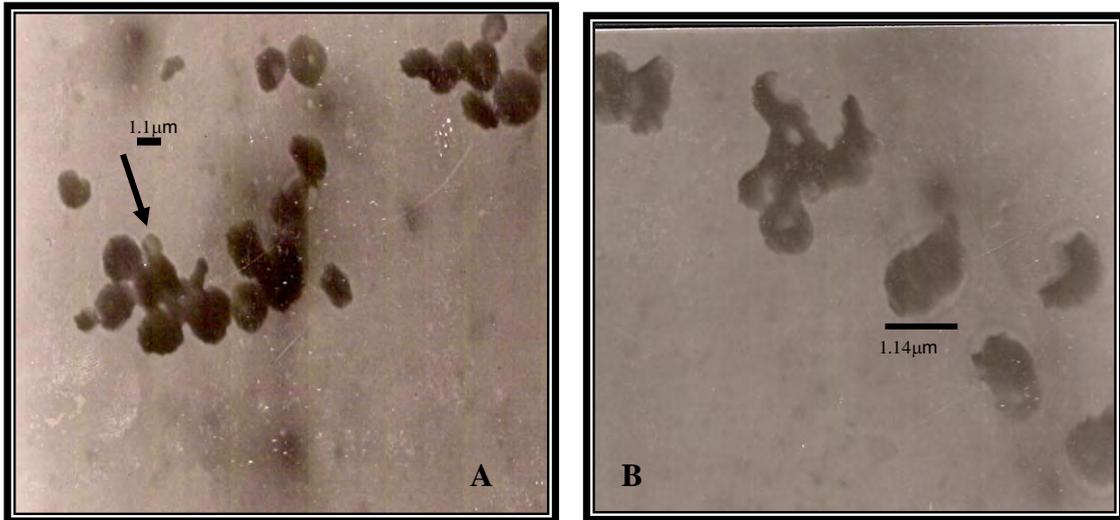
## 7.- FOTOGRAFÍAS OBTENIDAS EN LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN.

Una de las herramientas utilizadas para la evaluación del efecto del extracto sobre las bacterias es la Microscopía Electrónica de Transmisión ya que nos permite evidenciar parcialmente el mecanismo de acción del extracto, haciendo posible observar la morfología de la bacteria.

En las fotografías 11 y 12 correspondientes a *Staphylococcus aureus*, se puede observar en la primera fotografía que se trata de bacterias sin ninguna alteración (Figura 11), ya que se encuentran agrupadas en racimos, presentan estructura definida, además de encontrarse varias en un cuadrante, sin embargo con respecto a las fotografías 12(A y B) podemos observar que hay disminución en la misma bacteria, no poseen bordes definidos, lo cual hace parecer que el extracto tuvo su efecto a nivel de pared, lo que ocasiona además que no puedan agruparse como convencionalmente se encuentra a esta bacteria.

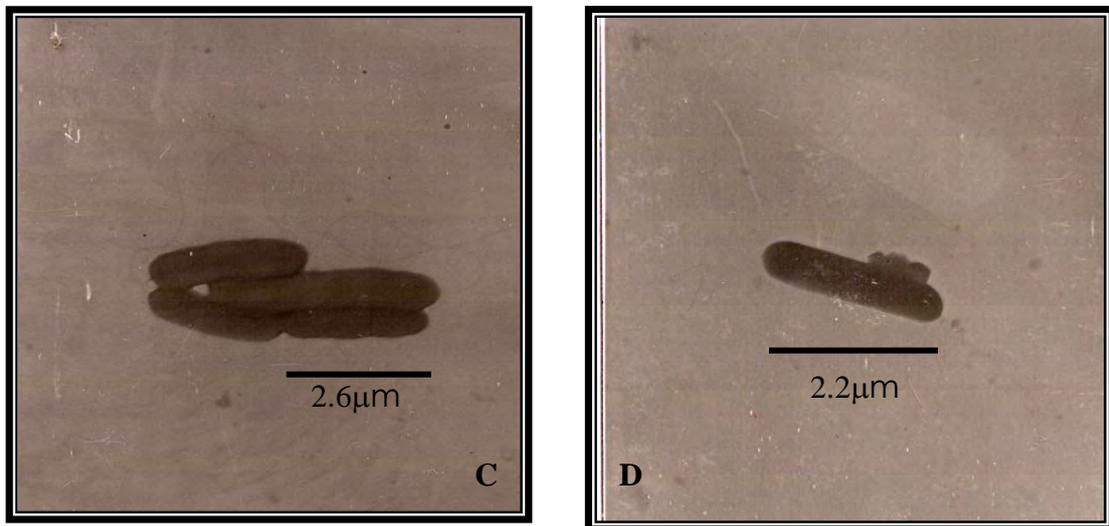


**Figura 11.-** Fotografía del Control de *Staphylococcus aureus* a 8000 magnificaciones.



**Figura 12.-** A y B *Staphylococcus aureus* con extracto a 10000 magnificaciones

Como en el caso de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* presenta morfología normal característica en la fotografía del lado izquierdo, pero en la fotografía del lado contrario se observan bordes irregulares en la membrana externa, al parecer no presenta flagelos y no se encuentra agrupada.



**Figura 13.-** C ) *Pseudomonas aeruginosa* control a 8000 magnificaciones.

D) *Pseudomonas aeruginosa* con extracto a 8000 magnificaciones.



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La técnica de dilución en microplaca es una técnica que posee grandes ventajas, como: rapidez, sencillez y cuantitatividad; este último atributo de gran interés al realizar pruebas de sensibilidad de un extracto a diferentes bacterias, debido a que podemos determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI); por el diseño de las microplacas se pueden realizar diferentes ensayos a una misma bacteria o a diferentes, lo que facilita homogenizar las condiciones de ensayo, al igual que la optimización de reactivos y material en comparación con la dilución en tubo. Convencionalmente para los ensayos de actividad antibacteriana, es utilizado Caldo Mueller Hinton ya que este medio proporciona los requerimientos necesarios a las bacterias para poder crecer no teniendo ningún elemento que permita favorecer las condiciones de inhibición al antibiótico, pero debido a que estas técnicas aun no se encuentran estandarizadas o reglamentadas de forma general, la estandarización de cada método se lleva a cabo a nivel laboratorio, de acuerdo a los elementos a estudiar, por ello se decidió trabajar con caldo BHI estéril a doble concentración para brindar a las bacterias las condiciones necesarias que permitieran su desarrollo y descartando así una variable que alterara el crecimiento de la bacteria.

Una de las ventajas al realizar diluciones en microplaca, es el hecho de homogenizar condiciones de ensayo, ya que no solo se corrieron las diluciones del extracto con la bacteria, sino que para darle veracidad y fiabilidad a los resultados obtenidos fue necesario correr a la par controles positivos, negativos y blancos, los cuales nos dieron la certeza para confirmar que realmente se estaba inhibiendo el crecimiento de la bacteria y que además nuestro extracto no poseía microorganismos que pudiesen alterar los bioensayos.

Si bien la técnica de dilución en microplaca posee muchas ventajas, en este caso no podíamos determinar la CMI por medio de la turbidez presentada en cada pozo, ya que el ojo humano posee diferencias de visibilidad entre individuos, es por ello que se utilizó la técnica colorimétrica de Mosmann en la cual el reactivo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es reducido a un compuesto coloreado de color azul (formazan), por medio de la enzima succinato deshidrogenasa, permitiendo determinar la funcionalidad de las bacterias. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular debido a que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.<sup>53</sup>



Realizando la lectura espectrofotométrica, se obtuvo de manera directa la concentración de bacterias viables en cada bioensayo, de forma que detectamos la concentración Mínima inhibitoria para cada caso.

Para *Staphylococcus aureus* se determino una CMI de 12500 $\mu$ g/ml, para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* fue de 3125 $\mu$ g/ml y para las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* de 1562.5 $\mu$ g/ml, estas concentraciones en comparación con las obtenidas por Firas A.(2007)<sup>46</sup> se encuentran muy elevadas ya que en su estudio determino una concentración de 62.5 $\mu$ g/ml para *Staphylococcus aureus*, 125  $\mu$ g/ml en *Salmonella typhi*, 500 $\mu$ g/ml en *Pseudomonas aeruginosa*, 250 $\mu$ g/ml en *Klebsiella pneumoniae*. Esto no indica que los resultados obtenidos en nuestros ensayos no sean favorables, ya que Firas A.(2007)<sup>46</sup> obtuvo estos valores tras la combinación del extracto metanolico y el aceite esencial que extrajo de la planta, lo que sin duda aumento la actividad debido a la cantidad de metabolitos presentes.

Esta comparación entre los valores obtenidos de los bioensayos en microplacas del extracto hidroalcoholico de *Thymus vulgaris* y otros estudios, nos hace reafirmar la importancia de la selección del método extractivo y de los disolventes a utilizar, ya que de ello dependerá la cantidad de metabolitos que podamos obtener de la planta; en muchos estudios realizados para determinar si una planta posee actividad antibacterial es requerida la identificación de compuestos presentes en el extracto o el aceite, ya sea que se decidieran trabajar en conjunto, lo cual en la mayoría de los casos es favorable, considerando que a menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos,<sup>46</sup> o con cada uno de los metabolitos, esto nos ayudaría a determinar los componentes activos a evaluar en cada caso.

Muchos de los componentes de *Thymus vulgaris* han sido aislados y probados de forma individual y conjunta, el conocer qué compuestos poseía nuestro extracto, no solo sería de ayuda para comparar la variación de la actividad reportada en otros estudios, sino que también es un parámetro de calidad, confirmando la presencia de ciertas estructuras químicas, que son características del extracto analizado; es por ello que al carecer de este análisis previo a los bioensayos hago referencia al trabajo realizado por Solano en el 2006 en la Facultad de Estudios Superiores – Campus Zaragoza, donde se obtiene el aceite esencial por arrastre de vapor del tomillo, al igual que la extracción con una mezcla hidroalcoholica y una infusión, de las cuales realizaron Cromatografía de gases para la determinación de los compuestos presentes, encontrando que el Carvacrol, el cual es un terpeno fenólico presente en el Tomillo, al que se le atribuye



actividad antibacteriana, está presente en mayor cantidad en el aceite, en menor proporción en el extracto y casi imperceptible en la infusión, a diferencia de el Timol que se encuentra en mayor proporción en comparación con el Carvacrol, pero que al igual que este último su proporción varía de acuerdo al método de la extracción.

Como se observa, la mayor actividad antibacteriana se encuentra en las bacterias Gram(-), esto es debido a las diferencias morfológicas que hay entre ellas, la presencia de una membrana externa y de una delgada capa de peptidoglicano las hace más susceptibles a los componentes del extracto. Esto debido a que los Fenoles interrumpen el transporte de electrones e inhiben enzimas ligadas a la membrana.<sup>55</sup>

Los resultados de la prueba bactericida bacteriostática como se muestran en las figuras 7-10, para todos los casos se observa que el efecto solo fue bacteriostático ya que las bacterias crecen sin ningún problema, y solo a ciertas concentraciones se ve alterada la morfología de las colonias, pudiendo deberse a las posibles modificaciones que sufrieron en la membrana, ya que el efecto que sufre la bacteria es dependiente de la concentración.<sup>55</sup>

La MET es una herramienta eficaz para determinar el efecto que ejerce el extracto en las bacterias, permitiendo visualizar de forma directa las modificaciones que hace en estas.

Al poder observar de forma directa los efectos que ocasionó la exposición del extracto sobre la bacteria, podemos afirmar que en todas ellas hay alteraciones a nivel de membrana y pared celular; esta última puede ser destruida por acción de algunos agentes, como la lisozima que rompe los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 entre las unidades N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, que en consecuencia debilita la pared; lo que ocasiona que el agua pueda entrar a la célula produciendo su lisis. Pero si esta se encuentra en condiciones isotónicas, la lisozima puede digerir el peptidoglicano sin embargo el agua no entraría a la célula lo que no ocasionaría la lisis de la célula, formándose un protoplasto (bacteria que ha perdido su pared celular), es decir que se considera a los protoplastos como formas normalmente libres de cualquier material residual de la pared celular (Gram +), mientras que los esferoplastos contienen, por lo general restos de la pared unidos a la membrana (Gram -).<sup>1</sup>

Como se observa en la Figura 11, correspondiente al control de *Staphylococcus aureus* se muestra una morfología normal encontrando a las bacterias en agrupación de tetradas y racimos, con bordes regulares, mientras que en la Figura 12 (Bacteria con extracto) se muestra modificada en los bordes, ya que no se encuentran definidos, de igual manera



la posible formación de protoplastos, como lo menciona en su trabajo Perez A. (2008), en la Figura 12-B (Bacteria con extracto) también hay separación entre el contenido citoplasmático y la pared celular, que se nota como cápsulas traslucidas.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, en la Figura 13-C (Control) se observan bacilos bien definidos con presencia de flagelos, lo cual es representativo de una bacteria normal, mientras que en la Figura 13-D (Bacteria con extracto) se observa que no hay agrupación, no se distingue la presencia de algún flagelo, además de la posible formación de esferoplastos.

A pesar de que muchos mecanismos de acción de los extractos no son conocidos exhaustivamente, se sabe que generalmente deben su actividad bactericida o bacteriostática sometida en la membrana celular, hecho que determina su integridad.<sup>42</sup> además de que los componentes fenólicos pueden ser capaces de acomplejar proteínas extracelulares y de la pared, ocasionando la desestabilización de enlaces.

Los resultados obtenidos a través de los bioensayos en microplacas así como las fotografías obtenidas en MET nos proporcionan un indicio de cómo este extracto puede ser capaz de ayudarnos en el tratamiento en contra de patógenos causantes de muchas infecciones. Sin embargo esto también se ve limitado debido a que los componentes a los cuales se asocia la actividad, no podrían ser administrados tan fácilmente a los pacientes.

La elaboración de estos proyectos son con la finalidad de iniciar una conciencia sobre los productos naturales como fuente para la elaboración de medicamentos resultando en muchos de los casos más beneficios que desventajas, sin embargo para llegar al punto de ser un medicamento como tal, faltaría mucho por hacer, estos bioensayos al igual que la MET del extracto con las bacterias, marcan la pauta para pensar que realmente cubren el perfil para ser utilizados con fin antibacterial, sin embargo existen un sin fin de técnicas que ayudarían a discernir cual sería la mejor forma de obtener los principios de la planta, realizar pruebas con una mayor gama de bacterias, utilizar más técnicas para dilucidar mecanismo de acción; realizar pruebas de dosis efecto, pruebas de toxicidad, en fin aún queda mucho por hacer.

Sin duda alguna este proyecto como muchos otros que se han realizado, marcan la pauta para continuar con los estudios de nuevos compuestos presentes en plantas que poseen actividad antibacterial, además de brindar los datos necesarios, para realizar modificaciones en las técnicas que puedan favorecer los ensayos.



## CONCLUSIONES

Se realizaron pruebas para evaluar la actividad antibacterial de tomillo en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*, observando que el extracto sí posee actividad bacteriostática en todas las bacterias mencionadas.

Se determinó por medio de una prueba cualitativa en placa que el extracto de *Thymus vulgaris* sí posee capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano.

Se llevaron a cabo los bioensayos con las bacterias de estudio de este proyecto determinando que para *Staphylococcus aureus* se determinó una CMI de 12500µg/ml, para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* fue de 3125µg/ml y para las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* de 1562.5µg/ml.

Por medio de la MET se observó que para las bacterias Gram(+) y Gram(-) el extracto ejerce su actividad a nivel de membrana celular, y principalmente en la pared ocasionando la formación de protoplastos y esferoplastos.



## R E F E R E N C I A S

- 1.- MADIGAN M.; MARTINKO J; PARKER J.(2004).Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid, España. Pág. 857-863.
- 2.- SILVA J. (2006).Resistencia a antibióticos. Revista Latinoamericana de microbiología. Vol.48, No.2, Pág. 105-112
- 3.- MURRAY P.; ROSENTHAL K.; DFAÜER M. (2005).Microbiología Médica.5ª edición. Ed. ELSEVIER. Madrid, España. Pág. 1,3,
- 4.- VELÁZQUEZ M.; (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud pública. México. Vol 47. No. 5. Pág. 381-387
- 5.- VILAR-COMPTE D, JACQUEMIN B, DÍAZ A, VELÁSQUEZ C, VOLKOW P. (2003). Brote por pseudomonas aeruginosa, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. Salud pública. México. Vol. 45. No. 5. Pág. 371-378
- 6.- ANDRADE V, SILVA J. (2004). Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. Salud pública. México. Vol. 46. No. 6. Pág. 524-528
- 7.- RODAS C, HALVORSEN K, IÑIGUEZ V. (2005). Multiresistencia antimicrobiana asociada a integrones en enteropatógenos de la diarrea infantil y *Escherichia coli* de la flora normal en niños menores de 5 años en la ciudad de La Paz. Cuadernos del hospital de clínicas. Bolivia. Vol.50. No. 2. Pág. 38-46
- 8.- CAMARENA J, SÁNCHEZ R. (1999). INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA. Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia, España.
- 9.- ECHEVARRIA J, IGLESIAS D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Revista medica Heredia. Vol. 14, No. 4, Pág. 195-203



- 10.- CAMACHO A, ACOSTA G, ROSITAS H, CANIZÁLEZ J.(2007). Resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital de enseñanza del norte de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, Vol. 27, No. 2. Pág. 44-48
- 11.- AYALA J, RÍOS H , VELARDE P, ARZOLA C, GUAJARDO C. (2006). Bacteremias: incidencia y resistencia antimicrobiana, tendencia a través de 15 años de seguimiento, *Medicina Interna de México*, Vol. 22, No. 4, Pág. 263-268
- 12.- CUBEROS L, CORDERO E, GARCÍA A, PACHÓN J. (2000). Infecciones por *Pseudomonas* spp. Servicio de Microbiología y Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. *Medicine*. Vol. 7. No.78. Pág. 3629-3633
- 13.- ESPINAL P, MANTILLA J, SAAVEDRA C, LEAL A, ALPUCHE C, VALENZUELA E.(2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*. Vol.24. Pág. 252-261
- 14.- LÁZARO L. (2003). Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. Barcelona, España. Pág.5-10
- 15.- GARCÍA P. (2003). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Infectología*. Vol. 20. No. 1.Pág.11 -23
- 16.- FAMIGLIETTI A, QUINTEROS M, VÁZQUEZ M , MARÍN M, NICOLA F, RADICE M, GALAS M, PASTERÁN F, BANTAR C, CASELLAS J, KOVENSKY PUPKO J, COUTO E, GOLDBERG M, LOPARDO H, GUTKIND G, SOLOAGA R.(2005). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Microbiología*. Vol. 37. Pág.57-66
- 17.- MORALES R. (2003). Terapia de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Revista Infectología*. Vol. 20. No. 1. Pág. 24-27
- 18.- ZAIDI M, LÓPEZ C, CALVA E. (2006). Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de microbiología*. Vol. 48, No. 2. Pag. 121 – 125.
- 19.- GUTIÉRREZ L, MONTIEL E, AGUILERA P, GONZÁLEZ M. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública México*; Vol. 42. Pág. 490-495.



- 20.- BRIONES E. (2006). La resistencia bacteriana y el mal uso de antibióticos en hospitales. Una historia sin fin. Revista de enfermedades infecciosas en pediatría. México. Vol. 19, No. 76, Pág. 112-120.
- 21.- CALVA E.( 2001): *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. *Instituto de Biotecnología, UNAM*.Pag.1-12.
- 22.-MARTINEZ R. (2006). Estudio Químico y actividad antimicrobiana *in Vitro* de la especie medicinal *Thymus vulgaris*. Facultad de Química UNAM. Pag.20-22
- 23.- BERNAL VANACLOCHA, SALVADOR CAÑIGUERAL. (2003). Fitoterapia, vademecum de prescripción, 4ªedición. Editorial. MASSON. pp. 476-477
- 24.- KUKLINSKI CLAUDIA. (2001). Farmacognosia "Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural". Ed. Omega. Barcelona España. pp. 15-22,252-253.
- 25.- BRUNETON JEAN. (1991). Elementos de fotoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. Zaragoza España. pp.260-262.
- 26.- TREASE. GEORGE EDWARD. WILLIAM CHARLES EVANS. (1984). Farmacognosia. 12ª ed. Continental. México. pp. 428
- 27.- M. CEDRIC, D. WAKELIN, J. PLAYFAIR, I, ROITT.(2005). Microbiología médica. 2ªedición. Editorial Harcourt. España, Madrid. pp.513, 524-527
- 28.- J. ALONSO.(2004). Tratado de fitofarmacos y nutraceuticos. Editorial Corpus. Buenos Aires, Argentina. pp 276-281
- 29.- O. SUSSMANN, MATTOS L, RESTREPO A. Resistencia Bacteriana. Hospital Universitario San Ignacio. Unidad de Infectología.
- 30.- SÁNCHEZ RESÉNDIZ J. (2007). Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* en niños. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Mex. D.F. Marzo- Abril. Vol. 64. 90-98.
- 31.- GONZÁLES GALLARDO SOFÍA, HERNÁNDEZ BAUMGARTEN ELISEO, et al. (2003). Guía de microscopía electrónica. UNAM FES-C. México D.F.



- 32.- CERCENADO E. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. Servicio de Microbiología Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" . Madrid. España.
- 33.- RIVAS C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?.Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Revista QuímicaViva . Vol. 2. Pag. 63-75.
- 34.- GAMAL F. GAD, RAMADAN A. EL-DOMANY, HOSSAM M. ASHOUR. (2008). Infection/Inflammation Antimicrobial Susceptibility Profile of Pseudomonas aeruginosa Isolates in Egypt. From the Departments of Microbiology and Immunology, Faculties of Pharmacy, Minia University .Vol.180. Pag.176-181
- 35.- GRUTEKE P.,GOESSENS W., GILS J, PEERBOOMS P, LEMMENS-DEN N., BELKUM A., VERBRUGH H.(2003). Patterns of Resistance Associated with Integrons, the Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase SHV-5 Gene, and a Multidrug Efflux Pump of *Klebsiella pneumoniae* Causing a Nosocomial Outbreak. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Vol. 41, No. 3 p. 1161–1166
- 36.- PATERSON D. (2006). Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae Antibiotic Management Program, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. The American Journal of Medicine. Vol. 119. Pag.20–28
- 37.- MCCUDDIN Z.P., CARLSON S.A. , RASMUSSEN M.A., FRANKLIN S.K. (2006). Klebsiella to Salmonella gene transfer within rumen protozoa: Implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. Pre-harvest Food Safety and Enteric Disease Research Unit, National Animal Disease Center. Veterinary Microbiology. Vol. 114. Pag. 275–284
- 38.- DEPLANO A., DENIS O., POIREL L., HOCQUET D., NONHOFF C., BYL B., NORDMANN P., VINCENT J. L., STRUELENS M. J. (2005). Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Department of Microbiology, Infection Control, and Intensive Care UnitParis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Vol. 43, No. 3 Pag. 1198–1204
- 39.- SOUSA M., CRISOSTOMO M. I., SANCHES I., WU. S., FUZHONG J. (2003). Frequent Recovery of a Single Clonal Type of Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus from Patients in Two Hospitals in Taiwan and China. Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Tecnología Química e Biológica de Universidad Nova de Lisboa, Portugal. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Vol. 41, No. 1. Pag. 159–163



- 40.- AKINYEMIA K.O., SMITHB S.I., OYEFOLUA B., COKERC A.O. (2005). Multidrug resistance in Salmonella enterica serovar typhi isolated from patients with typhoid fever complications in Lagos, Nigeria Department of Microbiology, Lagos State University, Vol. 119. Pag. 321–327
- 41.- GUTIERREZ J., BARRY-RYAN C., BOURKE P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology. Vol. 26. Pag. 142–150
- 42.-SHIVA C. (2007). Estudio de la actividad antibacteriana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores del crecimiento. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad y Anatomía Animal. Pag.
- 43.- BAUTISTA C., ACOSTA E., TOLEDO I. (2000). Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados. Vet. Méx., Vol. 31. No. 2. Pag. 101-107
- 44.- SOLANO E., CASTILLEJOS C., ÁLVAREZ L., ARELLANO A., LÓPEZ M., RÍOS R. (2006). Effect of the essential oil, infusion and ethanol extract of *thymus vulgaris* L., on the growth in vitro of group a  $\beta$ -hemolytic Streptococcus pyogenes. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, Vol. 9. No. 2. Pag. 73-77
- 45.- BÉZANGER, L; PINKAS, M; TORCK, M. (1986). Les Plantes dans la Therapeutique Moderne. 2<sup>a</sup>. Paris: Maloine, Pag. 420-2.
- 46.- RODDRIGUEZ J., AMADA E. (2001) Evaluación de la viabilidad celular, ensayo del MTT. Departamento de Bioquímica y Biología molecular. La Habana, Cuba. Pag.35-37
- 48.- ESSAWI T., SROUR M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology. Birzeit, Israel. Vol. 70. pag. 343-349
- 49.- HUDAIB M., SPERONI E., DI PIETRA A.(2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Bologna, Italy. Vol. 29. Pag. 691–700



- 50.- OSMAN S. (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* Vol. 36. Pag. 467–473
- 51.- FIRAS A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. Mosul, Iraq.
- 52.- SANABRIA A., CARDENAS L., PARROQUIANO M. (2002). Actividad antibacteriana y examen fitoquímico preliminar de siete angiospermas y una muestra de propóleo. *Facultad de Ciencias*. Bogota, Colombia. No. 31. Pag. 36-42
- 53.- FIGUEROA.M., VERDUGO. A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol.47, No. 1-2, Pag. 25-42.
- 54.- COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD. (2009). Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT).
- 55.- DOMINGO. D, LOPEZ. M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Ver Esp Quimioterap*. Vol.16 No. 4. Pag. 385-393.

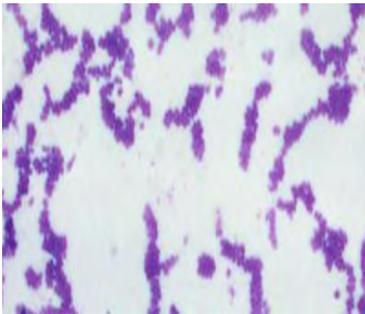


## APENDICE A

Tipificación de cepas bacterianas.

### ***Staphylococcus aureus***

- Agar Sangre: Colonias redondas, lisas, con  $\beta$ -hemolisis.
- Agar Sales y Manitol: Colonias amarillas, redondas, con vire del medio.



Cocos Gram (+)

| Pruebas bioquímicas | Resultado |
|---------------------|-----------|
| Coagulasa           | +         |
| Arginina            | +         |
| Nitratos            | +         |
| Glucosa             | +         |
| Sacarosa            | +         |
| Manitol             | +         |
| Urea                | +         |

### ***Pseudomonas aeruginosa***

- Agar Cetrimida: Colonias brillantes, confluentes, de borde continuo con pigmentación verde.



Bacilos Gram (-)

| Pruebas bioquímicas | Resultado |
|---------------------|-----------|
| Oxidasa             | +         |
| Motilidad           | +         |
| Esculina            | -         |
| Arginina            | +         |
| Lisina              | -         |
| Nitratos            | +         |
| Urea                | +         |
| Glucosa             | +         |
| Lactosa             | -         |
| Maltosa             | +         |



### ***Klebsiella pneumoniae***

- Agar McConkey: Colonias redondas, bordes regulares, fermentadoras de lactosa



Bacilos Gram (-)

| Pruebas bioquímicas | Resultado |
|---------------------|-----------|
| Motilidad           | -         |
| Indol               | -         |
| Rojo de Metilo      | -         |
| Voges Proskauer     | +         |
| Citratos            | +         |
| Lisina              | +         |
| Malonatos           | +         |
| Ácido sulfhídrico   | -         |

### ***Salmonella typhi***

- Agar Salmonella Shigella: Colonias planas, amarillas con centro negro



Bacilos Gram (-)

| Pruebas bioquímicas | Resultado |
|---------------------|-----------|
| Rojo de Metilo      | +         |
| Voges Proskauer     | -         |
| Indol               | -         |
| Citratos            | -         |
| Urea                | -         |
| Motilidad           | +         |
| Lisina              | +         |
| Arginina            | +         |
| Ácido sulfhídrico   | +         |
| Malonatos           | -         |



## A P E N D I C E B

### Medios de cultivo y Soluciones utilizadas

#### Caldo Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Cloruro de sodio               | 5,0g  |
| Dextrosa                       | 2,0g  |
| Fosfato disodico               | 2,5g  |
| Infusión de Cerebro de ternera | 7,7g  |
| Infusión de corazón de res     | 9,8g  |
| Peptona de gelatina            | 10,0g |

Disolver 37g en un litro de agua destilada, reposar de 10-15 minutos hasta la disolución completa, hervir hasta el punto de ebullición, verter en tubos de ensaye, estandarizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos. pH= 7.4±0.2

#### Agar Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Agar Agar                      | 15,0 g |
| Cloruro de sodio               | 5,0g   |
| Dextrosa                       | 2,0g   |
| Fosfato disodico               | 2,5g   |
| Infusión de Cerebro de ternera | g      |
| Infusión de corazón de res     | g      |
| Peptona especial               | 10,0g  |

Disolver 52,0g del medio en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolver por completo, estandarizar la autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos. Enfriar a 45-50°C, vaciar en cajas de Petri estériles. pH= 7.4±0.2

#### Agar Nutritivo (BIOXON)

Disolver 23,0g del medio en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolver por completo, estandarizar la autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos. Enfriar a 45-50°C, vaciar en cajas de Petri estériles. pH=



### **Solución Salina Fisiológica**

Disolver 0,9g de NaCl en un litro de agua destilada, agitar frecuentemente para disolver por completo, verter en tubos de ensaye y estandarizar la autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos.

### **MTT ó 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-dimetiltetrazolio (SIGMA-21 28)**

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5mg/ml. Filtrar la solución con una membrana de 0.22 µm. Guardar a una temperatura de 4°C, hasta su uso.

### **Ácido Fosfotúgstico**

El ácido es una solución al 2% ajustada al pH de 7.0 mediante NaOH 1N.

### **Glutaraldehido-paraformaldehído (Karnosky)**

Prepare una solución amortiguadora de fosfatos al 0.2M o una solución de cacodilato al 0.2N a pH 7.0.

Prepare 20ml de una solución de paraformaldehído al 10% disolviendo 2g de paraformaldehído en polvo en 20ml de agua destilada calentando a 60-70°C mientras se agita vigorosamente (en campana de extracción de gases). Agregue unas gotas de NaOH 0.2N hasta que la solución se vuelva transparente. Esperar a que se enfríe.

Amortiguador de fosfatos al 0.2M -----50ml.

Paraformaldehído al 10% en agua -----20ml.

Glutaraldehído al 25% en agua -----10ml.

Agua destilada hasta volumen final de -----100ml.



APENDICE C



EXTRACTOS SIGMA

HOJA TECNICA

**TOMILLO**

*Thymus vulgaris*

CODIGO 3078HC

|                         |   |
|-------------------------|---|
| DESCRIPCIÓN             | Extracto hidroalcoholico de Tomillo   |
| APARIENCIA              | Líquido translúcido - ligeramente turbio  |
| COLOR                   | Ámbar   |
| OLOR                    | Característico  |
| MEDIO                   | Agua - alcohol  |
| SOLUBILIDAD             | Agua - Alcoholes - Glicoles - Tensoactivos  |
| <b>ESPECIFICACIONES</b> |   |
| DENSIDAD (20°C)         | 0.900 - 1.000   |
| INDICE DE REFRACCIÓN    | 1.3618 - 1.3790   |
| °BRIX                   | 18.8 - 28.8   |
| MESOFILCOS AEROBIOS     | < 100 ufc / ml  |
| HONGOS Y LEVADURAS      | < 10 ufc / ml   |
| COLIFORMES              | < 10 ufc / ml   |
| COMPONENTES PRIMARIOS   | Timol, geraniol, carvacrol, linalol, tirpeneol, flavonoides, ácidos fenólicos.  |
| PROPIEDADES             | Infecciones de vías respiratorias, enfisema, bronquitis, insuficiencia biliar. Externamente para curar infecciones de la piel, vaginitis, estomatitis y contra la caída del pelo. |
| USO                     | Cosmético.  |
| ALMACENAMIENTO          | Temperatura ambiente y protegido de la luz, si presenta precipitado agite hasta su completa incorporación.  |
| DOSIFICACIÓN            | Capilar 1 - 3 %, Corporal 3 - 5 %, Facial 5 - 7 %   |