

ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS IN VITRO, SOBRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

POR RAMIRO MARTÍNEZ SILVA *
ANDRÉS SORIANO LLERAS **
MIGUEL GUZMÁN URREGO

(Con la ayuda técnica de la señorita Nelly Rodríguez).

Desde que se inició el tratamiento de las enfermedades infecciosas por medio de los agentes quimioterápicos, se han venido observando importantes modificaciones en la ecología bacteriana. En los últimos años, como consecuencia del amplio uso de estas sustancias, se han apreciado sobre infecciones en un terreno colonizado previamente por otros agentes etiológicos y también se han presentado infecciones por gérmenes que anteriormente eran desconocidos en una región determinada.

En el caso concreto de las *Pseudomonas aeruginosa* las publicaciones de cuadros clínicos, de gravedad variable, atribuidos a este germen se han ido acumulando en los últimos años (¹, ², ³, ⁴, ⁵, ⁶, ⁷, ⁸, ⁹, ¹⁰ y ¹¹). Dada la poca sensibilidad que ostentan estos microorganismos frente a los antibióticos de empleo habitual, su aparición

en el curso de una infección debe considerarse como desfavorable.

Pensamos que en nuestro medio las sobreinfecciones por gérmenes de esta especie desempeñan un papel importante a juzgar por el número, relativamente elevado, que hemos encontrado en el curso de un estudio sobre etiología bacteriana de las diarreas infantiles.

MATERIAL Y METODOS

1) *Gérmenes*.—Se han estudiado 27 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, obtenidas por coprocultivo de niños, cuya edad oscilaba entre 17 días y 6 años, que habían sido sometidos a un tratamiento por uno o varios antibióticos durante períodos que variaban entre dos días y dos meses.

Además, se estudiaron tres cepas aisladas por urocultivos de individuos con infecciones antiguas de vías urinarias.

Los gérmenes se aislaron en el período de un año, que va de agosto de 1959 a septiembre de 1960, siendo archivados a una temperatura de 4° C.

* Profesor de Microbiología en la Escuela de Salud Pública. Universidad Nacional.

** Profesor agregado de Bacteriología en la Facultad de Medicina. Universidad Nacional.

hasta el momento de realizar las pruebas de sensibilidad.

2) *Antibióticos*.—Albamicina, clorhidrato de tetraciclina, sigmamicina (clorhidrato de odenadomicina y tetraciclina), Kantrex (sulfato de Kamicina), Toxitetraciclina, penicilina (sal sódica), sulfato de dihidroestreptomomicina, sulfato de neomicina, sulfato de polimixina B, colimicina (colistina) y cloranfenicol.

3) Como medio de cultivo se ha utilizado agua de peptona al 2%, adicionada de glucosa al 1%, con rojo fenol como indicador y con un pH de 7.2.

En una serie de 10 tubos que contenían 2 c. c. del medio anteriormente indicado, se adicionaban al primero 2 c. c. del antibiótico experimentado con una concentración de 1000 mgs. por c. c. A partir de ese tubo se hacían pases sucesivos de 2 c. c., con lo que se obtenían concentraciones del antibiótico que oscilaban entre 500 y 0.95 mcg. por c. c. En el caso de los antibióticos que no mostraban acción a estas concentraciones, se practicaba una nueva serie, agregando al primer tubo volúmenes iguales del antibiótico con una concentración de 40.000 mcg. por c. c. haciendo los pases a partir de este tubo. Si, como en el caso de la polimixina, la acción inhibitoria alcanzaba a concentraciones de 0.95 mcg. por c. c., se hacían pases posteriores hasta obtener una concentración final de 0.15 mcg. por c. c.

A esta mezcla de medio con antibiótico se agregaba una gota de un cultivo de 16 horas en caldo ordinario, diluído al 1/100, de la cepa que se quería investigar, de manera que el número de gérmenes en el momento de la siembra oscilaba entre 10^5 y 5×10^5 por c. c. Estos se llevaban a la estufa a 37° C., durante 16 a 18 horas y se procedía a hacer la lectura para determinar la menor concentra-

ción del antibiótico que inhibiera completamente el crecimiento, considerando como negativos los tubos en los que era posible apreciar turbidez.

RESULTADOS

Los resultados están resumidos en el cuadro número 1, en el que cada cepa está representada por un punto a nivel de las diferentes concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico.

Albamicina.—De las 30 cepas estudiadas, 8 eran inhibidas por concentraciones de 500 mcg. por c. c.; 13 por concentraciones de 250 mcg. por c. c.; 4 por concentraciones de 125 mcg. por c. c.; 4 por concentraciones de 62.5 mcg. por c. c., y 1 por una concentración de 15.6 mcg. por c. c.

Clorhidrato de tetraciclina.—Siete cepas eran sensibles a concentraciones de 125 mcg. por c. c.; 12 a concentraciones de 62.5 mcg. por c. c.; 9 a concentraciones de 31.2 mcg. por c. c., y 2 a concentraciones de 15.6 mcg. por c. c.

Sigmamicina.—Cuatro cepas eran inhibidas por concentraciones de 250 mcg. por c. c.; 7 por concentraciones de 125 mcg. por c. c.; 8 por concentraciones de 62.5; 3 por concentraciones de 31.2 mcg.; 4 por concentraciones de 15.6 mcg. por c. c., y 4 por concentraciones de 7.8 mcg. por c. c.

Kantrex.—Seis cepas eran inhibidas por concentraciones de 125 mcg. por c. c.; 14 cepas por concentraciones de 62.5 mcg. por c. c.; 6 cepas por concentraciones de 31.2 mcg. por c. c.; 3 cepas por concentraciones de 15.6 mcg. por c. c., y 1 cepa por una concentración de 7.8 mcg. por c. c.

Oxitetraciclina.—Dos cepas eran inhibidas por concentraciones de 62.5

mcg. por c. c.; 9 por concentraciones de 31.2 mcg. por c. c.; 15 por concentraciones de 15.6 mcg. por c. c., y 4 por concentraciones de 7.8 mcg. por c. c.

Penicilina.—Diez cepas eran inhibidas por concentraciones de 20.000 unidades por c.c.; 17 por concentraciones de 10.000 unidades, y 3 por concentraciones de 5.000 unidades.

Dihidroestreptomycin.—Una cepa era inhibida por una concentración de 10.000 mcg. por c. c.; 5 por concentraciones de 5.000 mcg. por c. c.; 13 por concentraciones de 2.500 mcg. por c. c.; 3 por concentraciones de 1.000 mcg. por c. c.; 1 por una concentración de 250 mcg. por c. c.; 1 por una concentración de 125 mcg. por c. c.; 5 por concentraciones de 31.2 mcg. por c. c., y 1 por una concentración de 7.8 por c. c.

Neomicina.—Siete cepas eran inhibidas por concentraciones de 31.2 mcg. por c. c.; 14 por concentraciones de 15.6 mcg. por c. c., y 9 por concentraciones de 7.8 mcg. por c. c.

Polimixina B.—Dos cepas eran inhibidas por concentraciones de 3.9 mcg. por c. c.; 5 por concentraciones de 1.9 mcg por c. c.; 7 por concentraciones de 0.95 mcg. por c. c.; 15 por concentraciones de 0.47 mcg. por c. c., y 1 por una concentración de 0.23 mcg. por c. c.

Colimicina.—Siete cepas eran inhibidas por concentraciones de 62.5 mcg. por c. c., y las 23 restantes por concentraciones de 31.2 mcg. por c. c.

Cloranfenicol.—Cuatro cepas eran inhibidas por concentraciones de 500 mcg. por c. c.; 5 por concentraciones de 125 mcg. por c. c.; 13 por concentraciones de 62.5 mcg. por c. c.; 7 por concentraciones de 31.2 mcg.

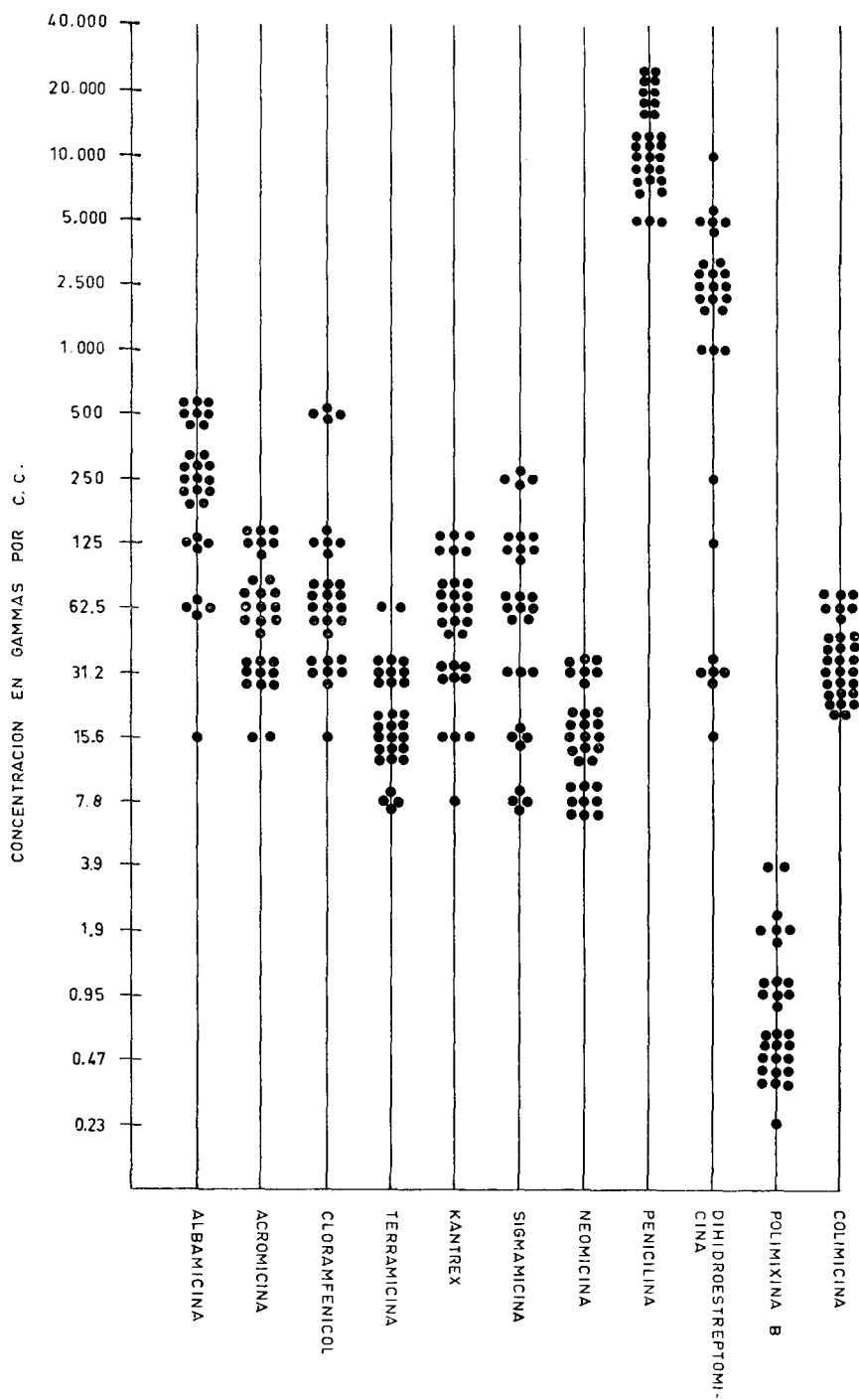
por c. c., y 1 por una concentración de 15.6 mcg. por c. c. (Ver cuadro).

DISCUSION

Con las 30 cepas estudiadas, el agente que se ha mostrado más eficaz en la inhibición del desarrollo ha sido la polimixina B, cuyo margen de acción oscila entre concentraciones de 0.23 y 39 mcg. por c. c. Seguía en eficacia la neomicina que en concentraciones de 7.8 mcg. por c. c. inhibía el desarrollo del 30% de las cepas, y el 100% en concentraciones de 31.2 mcg. por c. c. La colimicina tiene un margen de acción muy estrecho con concentraciones inhibitorias mínimas que varían entre 31.2 y 62.5 mcg. por c. c. Otros antibióticos como las tetraciclinas y kantrex se muestran más irregulares oscilando entre 7.8 y 125 mcg. por c. c. La albamicina y el cloranfenicol muestran una irregularidad mayor todavía, pues las concentraciones inhibitorias son de 15.6 mcg. por c. c. El que presenta un margen más amplio es la dihidroestreptomycin, cuyos límites están representados por 15.6 y 10.000 mcg. por c. c. Para la penicilina los límites varían entre 5.000 y 20.000 unidades por c. c.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (¹², ¹³, ¹⁴, ¹⁵, ¹⁶, ¹⁷, ¹⁸, ¹⁹, ²⁰ y ²¹), quienes encuentran que la polimixina es constante en su acción y por lo tanto el antibiótico de elección solo o en combinación con otro (²³, ²⁴ y ²⁵), en las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia frente a concentraciones tan elevadas de los otros antibióticos puede ser consecuencia de la selección de mutantes resistentes que se presentan en el curso del tratamiento por los agentes quimioterápicos. Afortunada-

ACCION INHIBITORIA DE LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE AN- TIBIOTICOS



mente el índice de mutación de la *Pseudomonas aeruginosa* frente a la polimixina B es de un orden tan elevado que, prácticamente, no se han producido cepas resistentes en el tiempo que se lleva administrando este antibiótico. La experiencia de Pulaski y Rosenberg ²⁶ es un argumento a favor de esta manera de pensar. Estos autores realizaron cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* en concentraciones subletales de Polimixina B durante 27 pases sucesivos, sin lograr un aumento significativo de resistencia; pero en cambio la misma experiencia realizada con otros antibióticos, como penicilina y estreptomycin, después de 3 subcultivos condujo a la obtención de cepas altamente resistentes.

Es de temer que la experiencia de Pulaski y Rosenberg se esté repitiendo de manera inadvertida *in vivo*, con las consecuencias que son de temer. Por ejemplo, la administración oral de tetraciclina con una dosis de 1.000 miligramos seguida por una de 250 miligramos cada 6 horas, permite obtener en el torrente circulatorio un nivel que oscila entre 2.64 y 3.32 mcg. por c. c., mientras que la eliminación por la orina llega a niveles de 88.7 a 307.4 mcg. por c. c. ²⁷.

La administración por vía intravenosa de los mismos antibióticos a razón de 12.5 miligramos por kilo de peso en niños, y 500 miligramos en el adulto, todavía permite niveles a las 18 horas, que oscilan entre 10 y 40 mcg. por c. c. ²⁸.

Con otros antibióticos como la albamicina, la administración de 20 mili-

gramos por kilo de peso, permite niveles que van desde 96 mcg. por c. c. a la hora, hasta 32 a las 8 horas; y con la mitad de la dosis las cifras son de 64 mcg. hasta 14 mcg. por c. c. ²⁹.

Con estos niveles de antibióticos se puede actuar sobre los agentes causales que sean sensibles. Pero su administración no sólo actúa sobre los microorganismos responsables del proceso infeccioso sino también sobre la flora microbiana normal, produciéndose así una modificación del equilibrio que puede originar la multiplicación y colonización de especies que estaban limitadas en su crecimiento y acción.

RESUMEN

Se han estudiado 30 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en su comportamiento frente a 11 antibióticos, determinándose las concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento.

El más uniformemente activo ha demostrado ser la polimixina B, siguiéndola la neomicina y las tetraciclinas.

SUMMARY

Thirty strains of *Pseudomonas Aeruginosa* were studied in relation to their sensitivity to eleven antibiotics by determining the minimum concentrations inhibiting their growth.

Polymyxin B was demonstrated to be the most uniformly active, followed by Neomycin and the Tetracyclines.

BIBLIOGRAFIA

- 1 STANLEY, M. M.: *Bacillus Pyocyaneus* Infections; Review Report of Cases and Discussion of Newer Therapy Including Streptomycin. *Am. J. Med.*, 2: 253-277, March; 347. April, 1947.
- 2 FLORMAN, A. L., & SCHIFRIN, N.: Observations on a Small Outbreak of Infantile Diarrhea Associated with *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Pediat.*, 36: 758-766. June, 1950.
- 3 GARRARD, S. D., RICHMOND, J. B., & HIRSCH, M. M.: *Pseudomonas Aeruginosa* Infection as a Complication of Therapy in Pancreatic Fibrosis (Mucoviscidosis). *Pediatrics*, 8: 482-488. Oct., 1951.
- 4 MOREAU, R., CLER, R., NATIVELLE, R., & ETIENNE: Septicémie à "*Pseudomonas Aeruginosa*" (bacille pyocyanique) révélée par une agranulocytose et terminée par une leucose maligne. *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 67: 705-710. Mai 18-25, 1951.
- 5 ANDRÉ, A., DECORTIS-CONSTANT, M., & DOUHA, H.: A propos des Infections par bacille pyocyanique. *Rev. Méd. Liège*, 7: 111-115. Fev. 15, 1952.
- 6 YOW, E. M.: Development of *Proteus* and *Pseudomonas* Infections During Antibiotic Therapy. *J. A. M. A.*, 149: 1184-1188. July 26, 1952.
- 7 GABY, W. L. & FREE, E.: Occurrence and Identification of Non Pigmented Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* in the Clinical Laboratory. *J. Bact. Balt.*, 65: 746. June, 1953.
- 8 LOWBURY, E. J. L., & FOX, J.: The Epidemiology of Infection with *Pseudomonas Pyocyanea* in a Burns Unit. *J. Hyg. Lond.*, 52: 403-416. Sept., 1954.
- 9 RANTZ, L. A.: Consequences of the Widespread Use of Antibiotics. *California M.*, 81: 1-3. July, 1954.
- 10 POTEI, J.: Zur Infektion mit *Pseudomonas Aeruginosa*, *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 162: 44-48. 1955.
- 11 FORKNER, C. E., FREI, E., EDGCOMB, J. H., & UTZ, J. P.: *Pseudomonas* Septicemia. Observations on Twenty-three Cases. *Am. J. Med.*, 25: 877-889. Dec., 1958.
- 12 ERWIN, C. P., WAISBREN, B. A. & KRUSE, R.: Clinical and Laboratory Studies of Infections due to *Pseudomonas Aeruginosa* and *Pseudomonas* Species. *Am. J. M. Sc.*, 226: 525-532. Nov., 1953.
- 13 SHERWOOD, M. B., DELAGE, J. W., & HERMAN, L. G.: The Present Status of Polymyxin B. with Respect to *Pseudomonas Aeruginosa*. *En: Antibiotics Annual, 1953-1954*. New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1953, pp. 560-564.
- 14 YOW, E. M., & TOWNSEND, E. S.: A Comparison of the Sensitivity of *Pseudomonas Aeruginosa* to Various Antibiotics. *Antibiotics*, 3: 709-717. July, 1953.
- 15 RIO, G. R., & CANAZZA, S.: Azione combinata di antibiotici "in vitro"; Effetti di somma e potenziamento delle associazioni di chloramfenicolo, clorotetraciclina e ossitetraciclina tra di loro sulla *Pseudomonas Aeruginosa*. *Atti Soc. Med. Chir. Padova*, 31: 53. 1954.
- 16 MOLLARET, L. & WARLUZEL, Y.: Echec des antibiotiques "in vitro"; Action nette des sulfamides sur le bacille pyocyanique *Pseudomonas Aeruginosa*. *Bull. Acad. Nat. Méd. Par.*, 138: 310-312. Juin 1-15, 1954.
- 17 HACKL, H.: Bakteriologische Untersuchungen bei Infektionen mit *Pseudomonas Aeruginosa*. *Arch. Hyg. Münch.* 140: 264-271. Juni, 1956.
- 18 BRUN, J., VIALIER, J., BERTOYE, A., & COURTIEU, A. L.: Évolution de la sensibilité aux antibiotiques et aux antiseptiques de souches d'un *Pseudomonas Aeruginosa*. *C. Rend. Soc. Biol.*, 150: 183-185. 28 Mai, 1956.
- 19 OSKAM, H. J.: Determination of the Sensitivity of Bacteria to Combinations of Antibiotics In Vitro; Discussion of Some Results, Especially with the Combination Tetracyclin Erythromycin. *Acta Med. Scand.*, 155: 335-351. Oct. 15, 1956.
- 20 ROY, T. E., COLLINS, A. M., CRAIG, G. & DUNCAN, I. B.: A Survey of the Incidence of Resistance to Antibiotics in Bacteria Isolated in a Children's Hospital. *Canad. M. Ass. J.*, 77: 844-850. Nov. 1, 1957.
- 21 ANDRIEU, G., MONNIER, J., & BOURSE, R.: La sensibilité du bacille pyocyanique aux agents anti-bactériens d'utilisa-

- tion clinique. Ann. Inst. Pasteur, Par., 92: 176-189. Fev., 1957.
- 22 NOVEL, É., & PONGRATZ, É.: Pyocyanique et antibiotiques usuels. Étude de 112 souches isolées durant les années 1954, 1955 et 1956. Schweiz. Zschr. allg. Path., 20: 552-558. 1957.
- 23 VACCA, J. B.: The pattern of Combined Effect of Polymyxin B. and Oxytetracycline In Vitro on Pseudomonas Aeruginosa. Antibiotics, 6: 130-134. Feb., 1956.
- 24 BODÓ, T., & GYENGESI, L.: Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Pseudomonas pyocyanea-und Proteus vulgaris. Stämmen gegen kombinierte Antibiotica. Mschr. Kinderh., 104: 422-423. Okt., 1956.
- 25 CLAPPER, W. E., & SUN, C.: The In Vitro Effect of Combinations of Antibiotics on Resistant Strains of Bacteria Commonly Found in Urinary Tract Infections. Antibiotics, 7: 75-80. Feb., 1957.
- 26 PULASKI, E. J., & ROSENBERG, M. L.: Use of Polymyxin in gram negative Urinary Tract Infections. J. Urol., 62: 564-573. Oct., 1949.
- 27 DICKISON, H. L., CRONK, G. A., & MANN, C. H.: Tetracycline: Further Studies on the Maintenance of Blood Levels. En: Antibiotics Annual, 1955-1956. New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1956, pp. 349-353.
- 28 WOOD, W. S., & KIPN.S, G. P.: The Concentrations of Tetracycline, Chlor-tetracycline and Oxytetracycline in the Cerebrospinal Fluid After Intravenous Administration. En: Antibiotics Annual 1953-1954. New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1953, pp. 98-101.
- 29 LIN, F. K., & CORIELL, L. L.: Streptovivcin: Laboratory and Clinical Studies in the Pediatric Age Group. En: Antibiotics Annual, 1955-1956. New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1956, pp. 634-639.