



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FARMACOLOGIA, PEDIATRIA Y RADIOLOGIA

INTERACCIONES DE ANTIBIÓTICOS SOBRE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

AUTORA: Encarnación Clavijo Frutos

DIRECTOR: Evelio José Perea Pérez

6 de Septiembre de 1985

T.D.
C/53

INTERACCIONES DE ANTIBIOTICOS SOBRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

T.D.
C/53

TESIS para aspirar al grado de Doctor de
ENCARNACION CLAVIJO FRUTOS

Sevilla, 30 de julio de 1985

R. 11. 181



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TELEFOS. HOSPITAL 37 84 00 - EXT. 1234, 1200, 1206
FACULTAD 37 84 00 - EXT. 1373, 1462, 1412
41009 - SEVILLA

CATEDRATICO JEFE DEPARTAMENTO

PROF. EVELIO J. PEREA

PROFESORES TITULARES

M.^A VICTORIA BOROPIO

JOSE C. PALOMARES

JAVIER AZNAR

PROF. EVELIO J. PEREA, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla:

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "INTERACCIONES DE ANTIBIOTICOS SOBRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA;" ha sido realizada por D^a ENCARNACION CLAVIJO FRUTOS bajo mi dirección, y reúne a mi juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener con ella el título de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, expedimos el presente Certificado en Sevilla, a seis de septiembre de mil novecientos ochenta y cinco.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Evelio J. Perea', written over a horizontal line.

Prof. Evelio J. Perea

A Salvador, mi marido

AGRADECIMIENTOS

Al Prof.Dr.D.Evelio J.Perea Pérez a quien debo mi formación en Microbiología. Sin su dirección,estímulo y enseñanza hubiera sido imposible realizar esta Tesis.

A mis compañeros,Doña M^a del Carmen Nogales Pérez, quien me inició en este trabajo y me prestó su colaboración con gran generosidad, y Doña Isabel Garcia Luque que me ayudó en la última parte de este estudio,poniendo a punto las técnicas cromatográficas y facilitándome los datos de las mismas.

A la Profa.Dra.Doña M^a Victoria Borobio Enciso, por el aliento y la enseñanza que de ella he recibido continuamente.

A todos los componentes del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Sevilla por su ayuda permanente.

A la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de Málaga que dirigió lo referente a este apartado con una dedicación tan generosa como eficaz.

A Doña Dolores Sánchez Espinar por su inestimable ayuda en el Laboratorio.

A Doña Matilde Monge Troya por la pulcritud y dedicación en la mecanografía del texto.

A D.Rafael Mañas Frias que dibujó con tanto esmero las figuras.

INDICE

	<u>Pág</u>
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	2
1.2. INTERACCIONES DE ANTIBIOTICOS	6
2. PLANTEAMIENTO	11
3. MATERIAL Y METODOS	14
3.1. MATERIAL.....	15
3.1.1. Cepas bacterianas	15
3.1.2. Medios de cultivo	15
3.1.3. Reactivos y compuestos químicos	16
3.1.4. Antibióticos	16
3.1.5. Aparatos de medida	22
3.2. METODOS	22
3.2.1. Técnica de dilución en agar Mueller-Hinton	22
3.2.2. Técnica de dilución en cuadrado en medio sólido....	25
3.2.3. Técnica de la curva de muerte en medio líquido....	28
3.2.4. Técnica de cromatografía líquida de alta presión ...	33
3.2.5. Métodos estadísticos	39
4. RESULTADOS	41
4.1. RESULTADOS DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS	42
4.2. RESULTADOS DE LAS INTERACCIONES DE ANTIBIOTICOS	44
4.2.1. Resultados de la técnica de dilución en cuadrado...	44
4.2.2. Resultados de la curva de muerte	47

4.2.2.1. Efecto de las combinaciones de cefotaxima	47
4.2.2.2. Efecto de las combinaciones de ceftazidima ...	95
4.2.3. Resultados del análisis de la varianza	139
4.2.3.1. Recuento del número de UFC	139
4.2.3.2. Turbidez	142
4.2.3.3. pH	143
4.2.4. Resultados del estudio de regresión	159
5. DISCUSION	166
5.1. SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS	167
5.2. INTERACCIONES DE LOS ANTIBIOTICOS CON DISTINTOS METODOS.	171
5.3. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS CUR- VAS DE MUERTE.....	173
5.3.1. Modificaciones de la población bacteriana	173
5.3.2. Modificaciones de la turbidez del medio de cultivo ..	178
5.3.3. Modificaciones del pH	179
5.3.4. Modificaciones de los niveles de antibióticos	180
6. CONCLUSIONES	184
7. BIBLIOGRAFIA	188

1. INTRODUCCION

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES.

Las infecciones causadas por P.aeruginosa han aumentado considerablemente en los últimos años, planteándose su tratamiento como un problema difícil, tanto por su insensibilidad, como por la resistencia que presenta a muchos antibióticos (53,65,72,73,82,88,92,95,97,122,123,-140).

P.aeruginosa es un microorganismo del género Pseudomonas, caracterizado por ser un bacilo Gram negativo, aerobio estricto, de morfología variable, crece en agar sangre formando colonias de aspecto cremoso, rugoso o mucoso, color amarillo verdoso, con olor a manzana. Su hábitat natural es el suelo, agua, vegetales y aire. También se aísla en el 10% de las heces humanas (11,61,125,132,160). Sólo cuando encuentra las condiciones adecuadas, en sujetos con alteraciones de sus mecanismos de defensa o sometido a tratamiento inmunosupresor, va a producir patología (32,40,50, 70,71,110).

Los beta-lactámicos que vamos a estudiar son un grupo de antibióticos formado por penicilinas y cefalosporinas estrechamente relacionados, teniendo todos ellos un anillo beta-lactámico del cual depende la actividad antibacteriana.

Estructuralmente las penicilinas se caracterizan por tener un anillo de tiazolidina que contiene azufre unido a un anillo beta-lactámico y una cadena lateral que determina las características individuales de cada una. Las cefalosporinas son antibióticos semi-sintéticos derivados de Cefalosporina C producida por Cephalosporium acremonium. Su núcleo activo, el ácido 7-aminocephalosporánico, tiene un anillo beta-lactámico unido a otro de dihidrotiacina. Difiere básicamente de las penicilinas en que posee sólo dos puntos asimétricos comparados con los tres del

ácido-6-amino-penicilánico.

El mecanismo de acción de los beta-lactámicos, calificados como bactericidas, se traduce en una inhibición de las síntesis de proteínas estructurales de la pared bacteriana, aunque el de las penicilinas se haya estudiado mejor que el de las cefalosporinas. Hay descritos una serie de efectos moleculares que podrían resumirse en lo siguiente: Los beta-lactámicos presentan parcialmente una estructura semejante a la D--alanil-D-alanina, único componente de la pared de las células procarióticas y sustrato del enzima transpeptidasa. La inhibición de la transpeptidasa por esas estructuras análogas impide el entrecruzamiento de nuevas subunidades de mureina, componente esencial de la pared bacteriana. La ausencia de entrecruzamiento da lugar a una pared celular de estructura débil, y ésto permite la acumulación de masas citoplásmicas y la posterior rotura osmótica de la pared celular. Por otra parte es conocido que hay varios enzimas bacterianos que se inhiben por las penicilinas (carboxipeptidasas, endopeptidasas y transpeptidasas), existiendo también entre los diferentes beta-lactámicos, uniones específicas a "proteínas fijadoras de penicilinas" de las que dependen también efectos específicos. Los beta-lactámicos causan pérdida de la viabilidad de células intactas y en muchas especies pueden causar una completa lisis celular. Son activos frente a enterobacterias incluida P.aeruginosa, cocos Gram-positivo, cocos Gram-negativo y algunos anaerobios.

El principal mecanismo de resistencia de las bacterias a los beta-lactámicos es la producción de beta-lactamasas (grupo de enzimas capaces de hidrolizar el anillo beta-lactámico e inactivar el antibiótico). La efectividad de una betalactamasa de conferir resistencia a una cepa depende de varios factores: afinidad del enzima por el antibiótico beta-lactámico, velocidad en la reacción de hidrólisis y probablemente

la razón más importante es la cantidad de antibiótico expuesto a la acción enzimática.

Las bacterias Gram negativos producen una gran variedad de beta-lactamasas, algunas son predominantemente activas frente a penicilinas, mientras que otras son muy activas contra las cefalosporinas (13,21,64,-66 93,120,139).

Entre los posibles factores que afectan la actividad antimicrobiana de los beta-lactámicos hay que señalar el pH. La actividad es menor a pH básico y mayor a pH ácido (60).

Los aminoglicósidos son un grupo de antibióticos bactericidas estrechamente relacionados, derivados de actinomicetales, unos del género streptomices (framicetina, kanamicina, neomicina, paromomcina, estreptomycinina y tobramicina) y otros del género micromonospora (gentamicina y sisomicina). Son compuestos policatiónicos que se usan generalmente en forma de sales de sulfato y que contiene 2-desoxitriptamina, con amino-azúcares unidos por enlaces glicosidos. Se les ha denominado también aminociclitoles y aminoglucósidos.

Desde el punto de vista de sus efectos bacterianos, tienen el mismo espectro antimicrobiano. Actúan interfiriendo la síntesis de proteínas bacterianas, por unión irreversible a la porción 30 S del ribosoma.

Aunque el mecanismo exacto de interferencia de la síntesis de proteínas no esté suficientemente explicado, sí se sabe que el efecto es bactericida y ocurre rápidamente, no dependiendo de la fase de crecimiento de la célula bacteriana. Debido a sus fuertes cargas catiónicas, dañan las membranas celulares bacterianas al combinarse con grupos aniónicos de las membranas bacterianas, además pueden

bloquear la producción de energía en los primeros pasos metabólicos del ciclo de KREBS. (39,60,66,78, 93).

Son más activos contra bacilos Gram negativos. La mayoría de las bacterias Gram positivas y las anaerobias presentan resistencia natural a los mismos. Los mecanismos de resistencia se asocian a la existencia de plásmidos que son capaces de producir enzimas inactivantes por reacciones de fosforilación, acetilación o adenilación.

Se ha descrito un posible mecanismo no enzimático que determina la aparición de resistencia común con la que se presenta ante los demás aminoglicósidos, consistiendo en una relativa impermeabilidad, o una menor capacidad de unión a la bacteria (44).

La existencia de resistencia cruzada entre los aminoglicósidos depende de la prevalencia que en cada bacteria adquieran los mecanismos de resistencia, enzimáticos en unos casos, y no enzimáticos en otros (39,60, 66,78,93). Así se ha señalado que sisomicina es inactivada por los mismos enzimas conocidos que gentamicina, por nueve de los once enzimas conocidos que inactivan a la tobramicina, y por uno de los dos enzimas conocidos que inactivan la amicacina (92,116,128,-131).

Entre los posibles factores que afectan a la actividad antimicrobiana de los aminoglicósidos hay que señalar el pH. La actividad es menor a pH ácido, y mayor a pH alcalino (28). Por otra parte se ha señalado los efectos inhibidores de la acción antimicrobiana -in vitro- al incrementar la concentración de calcio y magnesio en el medio, (34,-39). Parece que no se debe a inactivación del aminoglicósido (161), sino que actúan en una zona externa de la membrana celular.

1.2. INTERACCIONES DE ANTIBIOTICOS.

Desde el año 1908, a propuesta de EHRLICH (22) se han venido utilizando de forma creciente combinaciones de quimioterápicos en determinadas infecciones. La indicación de tal medida terapéutica, venía aconsejada en las infecciones graves, o en aquellas producidas por gérmenes desconocidos o multirresistentes. Más tarde KROGSTAD (74) señala las razones teóricas que justifican el uso combinado de antibióticos basándose en las siguientes observaciones: a) Las combinaciones de antibióticos disminuyen la aparición de cepas resistentes, en aquellos casos que se necesita un tratamiento prolongado. b) Disminuyen la toxicidad secundaria al reducir la dosis del antibiótico tóxico, sobre todo cuando se hacen combinaciones con aminoglicósidos. c) La eficacia probada en las infecciones polimicrobianas o mixtas ya que cada antibiótico ejerce su efecto por un mecanismo de acción distinto. d) Por último, se sabe que algunos pacientes con determinadas afecciones graves, tuberculosis, endocarditis, etc, mejoran de forma llamativa cuando se usan combinaciones de antibióticos como tratamiento.

Otro dato a favor de las combinaciones es que los aminoglicósidos sólo carecen de actividad contra microorganismos Gram positivos importantes, como el estreptococo. Por esta razón una penicilina o cefalosporina se ha venido incorporando en forma combinada a la terapéutica de las infecciones producidas por éstos microorganismos (66,91).

Cuando dos antibióticos actúan simultáneamente sobre una población bacteriana homogénea, el efecto puede ser de:

Sinergia: Cuando la acción combinada es significativamente mayor que la suma de las acciones de los antibióticos separadamente.

Adición: Cuando la acción combinada es equivalente a la suma de las acciones de cada antibiótico por separado.

Indiferencia: Cuando la acción combinada de ambos antibióticos no es más potente que la del más efectivo empleado solo.

Antagonismo: Cuando la acción combinada es menor que la del antibiótico más efectivo si éste se emplea solo (62).

El término efecto sinérgico, usado para justificar la terapéutica de combinación, presenta consideraciones diferentes cuando se usa aplicado a estudios "in vitro", o en estudios "in vivo". De igual forma existe cierta controversia en cuanto a los criterios de interpretación de las técnicas utilizadas para su valoración (BEREMBAUM (9), NORDEN (104), WEINSTEIN (152)). Precisamente el efecto sinérgico "in vitro" ocurre con considerable regularidad cuando los aminoglicósidos se combinan con penicilinas antipseudomonas utilizadas en sujetos que presentaban alteraciones en sus mecanismos de defensas (ANDERSON (2), RAHAL (117), YOUNG (156,157)).

Los dos métodos más aceptados para conocer la interacción de antibióticos son: Uno estático, la técnica de dilución en cuadrado, en medio sólido; otro dinámico, la curva de muerte, en medio líquido (33,127,150). Con la primera se valora el efecto de la combinación en términos de inhibición o bacteriostasis, permitiendo poder estudiar varias cepas a la vez.

Con la curva de muerte, sin embargo, se obtienen los datos en términos de muerte bacteriana o efectos bactericidas, valorados en distintas fracciones de tiempo a lo largo de 24 horas. Entre las limitaciones de ésta técnica se encuentran: El no poder estudiar

simultáneamente más de una cepa. Además, las repetidas tomas de la muestra original a lo largo de las 24 horas, no permite estudiar un elevado número de combinaciones de antibióticos, ni utilizar una amplia gama de concentraciones. Pero, por otra parte, tiene la ventaja de posibilitar el estudio de la influencia de diversos parámetros en la interacción antibiótico-microorganismo. Los resultados de ambas técnicas muestran buena correlación en términos de bacteriostasis PEREA (112), WEINSTEIN (152).

Para algunos autores (BEREMBAUM (9), y SKALOVA (134)) la correlación entre ambos métodos de estudio de la acción combinada de los antibióticos depende en gran medida de los criterios elegidos. Otros, sin embargo, como MOELLERING (98) y NORDEN (103) afirman que no se pueden comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas ya que con ellas se miden efectos diferentes. La falta de correlación de ambos métodos según NORDEN (104) podría deberse a factores técnicos ya que ambas pruebas pueden no hacerse el mismo día y fundamentalmente, afirman también, que esas discrepancias podrían deberse a los diferentes criterios utilizados en la interpretación de los resultados.

La interpretación de los datos obtenidos con la técnica de dilución en cuadrado se puede hacer siguiendo un criterio de reducción de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) o valorando el índice de la concentración inhibitoria fraccionada (FIC). JAWETZ, (62) considera que existe sinergia cuando el efecto de una combinación excede a la suma algebraica del efecto de sus constituyentes separadamente. Otros autores DASCHNER (18), MOELLERING (98), NORDEN (104) afirman que existe sinergia cuando la concentración bactericida de cada uno de los antibióticos de la combinación se reduce a un 25% de la requerida por cada antibiótico sólo, para inhibir el crecimiento. De lo anteriormente expuesto podemos deducir que no existe unanimidad de criterios para

considerar una cepa como sinérgica frente a una combinación de antibióticos.

En cuanto al índice FIC hay que señalar que también existe controversia en cuanto a los criterios dados para interpretar los resultados. BEREMBAUM (8) introdujo este concepto como índice de interacción considerando que existe sinergia si es inferior a 1, adición si es igual a 1 y antagonismo cuando es superior a 1. Otros autores le dan valores distintos, así FELDMAN (26) considera que existe sinergia cuando el índice FIC es menor a 0,8, adición cuando va desde 0,8 a 1,2 y antagonismo si es mayor de 1,2. En el criterio seguido por ELION (23) y PEREA (112) la sinergia tiene lugar cuando el índice FIC es menor o igual a 0,75. Adición si está entre 0,75 y 1. Indiferencia si es mayor que 1, y antagonismo si es mayor o igual a 2.

En cuanto a la valoración de los efectos de combinación de antibióticos utilizando la curva de muerte en medio líquido, tampoco existe un criterio aceptado por todos. Mientras que unos consideran que existe sinergia cuando a las 4 horas la reducción del número de unidades formadoras de colonia (UFC) provocada por la combinación de antibióticos es al menos $1 \log_{10}$ superior a la reducción provocada por el antibiótico solo de mayor actividad FU (28), JAWETZ (62). Para otros la reducción es medida a las 24 horas siendo los valores de reducción cifras superiores a $2 \log_{10}$ (COOPER (115) y NORDEN (103), $3 \log_{10}$ (WEINSTEIN (152) o más, (THOMAS (139).

Al aplicar criterios bactericidas, se encuentra con frecuencia en las curvas de muerte un descenso en el número de bacterias viables hasta las 4 ú 8 horas, con un recrecimiento posterior. Esa incapacidad de mantener el ritmo de muerte bacteriana por parte de los antibióticos, solos ó en combinación, no tiene una explicación concluyente por el

momento. No hay datos suficientes para saber si dosis adicionales de antibióticos permitirían evitar el crecimiento. Tampoco se sabe si las bacterias cultivadas al final de las 24 horas tienen las mismas características morfológicas, estructurales, antigénicas de sensibilidad o resistencia a los antibióticos y a los factores inmunológicos inespecíficos que tenían las bacterias originales.

Todo ello obliga a una comprobación y selección adecuada de los métodos y criterios más idóneos para abordar con precisión el estudio de las interacciones de antibióticos.

2. PLANTEAMIENTO

El presente trabajo trata de abordar los siguientes aspectos:

a) El estudio de la sensibilidad de 100 cepas de P.aeruginosa frente a seis antibióticos betalactámicos (imipenema,cefotaxima,ceftazidima,moxalactam,cefoperazona,azlocilina) y tres aminoglicósidos (sisomicina,amicacina,gentamicina), mediante el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

b) Estudio de posibles interacciones entre los antibióticos betalactámicos y aminoglicósidos señalados en el apartado anterior sobre P.aeruginosa en medio de cultivo sólido. Mediante el cálculo del índice FIC se determinarán posibles efectos "sinérgicos", de "adición", "indiferentes", "antagónicos" ó "favorables" de los mismos.

c) Elaboración y estudio de las curvas de muerte en medio líquido de tres cepas de P.aeruginosa frente a dos betalactámicos (cefotaxima,-ceftazidima) y tres aminoglicósidos (sisomicina,amicacina y gentamicina) utilizados en concentraciones subinhibitorias ó inhibitorias. La elección de las concentraciones a utilizar vendrá determinada por el comportamiento que tengan previamente en el estudio señalado en el apartado b) con la técnica de dilución en cuadrado, en medio de cultivo sólido. Tomando muestras a las 0,1,2,4,8 y 24 horas valoraremos los siguientes aspectos: Las modificaciones en la población bacteriana; las variaciones en la sensibilidad y resistencia inicial del microorganismo; la turbidez y el pH del medio de cultivo y las variaciones en las concentraciones de los antibióticos utilizados.

La valoración de las modificaciones en la población bacteriana se hará estudiando las variaciones a lo largo del tiempo del número de colonias viables, los tipos morfológicos de colonias que aparezcan y las variaciones morfológicas de las células bacterianas, mediante técnicas de

tinción.

Se estudiará la evolución de la sensibilidad de las cepas a lo largo del tiempo para comprobar si se producen variaciones de las CMI iniciales en presencia de los antibióticos solos y en combinación. Se valorarán las modificaciones de la turbidez del medio de cultivo líquido comparándolo con el número de bacterias viables.

Se estudiarán las posibles variaciones en el pH del medio de cultivo líquido ya que éstas pueden suponer cambios en la actividad de los antibióticos.

Se valorarán igualmente las variaciones de las concentraciones de antibióticos a lo largo del tiempo mediante cromatografía líquida de alta presión, único método capaz de detectar concentraciones de dos antibióticos en combinación.

La información obtenida en la última parte nos permitirá comprender de una forma dinámica la interacción de los antibióticos y encontrar posibles explicaciones al resultado final.

Basados en este estudio se podrán sugerir nuevas pautas terapéuticas en las infecciones causadas por P.aeruginosa, que por la gravedad que suelen presentar, nos parecen del mayor interés.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL.

3.1.1. Cepas bacterianas.

Para el presente estudio, hemos utilizado 100 cepas de P.aeruginosa, aisladas de muestras clínicas procedentes de enfermos ingresados en el Hospital Universitario de Sevilla.

Las cepas control utilizadas en la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) fueron:

Cepas bacterianas	Referencias
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC 25923
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ATCC 27853
<u>Escherichia coli</u>	ATCC 25922

3.1.2. Medios de cultivo.

Caldo Mueller Hinton (MHB)(Difco).

Infusión de carne.	300 g.
Casamino ácidos.....	17,5 g.
Almidón soluble.	1,5 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

Agar Mueller Hinton (MHA)(Difco).

Infusión de carne.....	300 g.
Casamino ácidos.....	17,5 g.
Almidón soluble.....	1,5 g.
Agar.....	17 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

Agar sangre (AS)(Difco).

Infusión de corazón de buey.....	500 g.
Triptosa.....	10 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
Agar.....	15 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

1 ml. de sangre venosa, colocada en placa Petri más el medio estéril enfriado.

3.1.3. Reactivos y compuestos químicos.

Acetonitrilo.

Acido bórico.

Buffer fosfato.

EDTA.

Etanol.

Filtro millipore.

Gel de sílice.

Isopropanol.

Metanol.

2-mercaptoetanol.

O-oftalaldehido.

3.1.4. Antibióticos.

Hemos utilizado "polvo valorado" (solo y en combinación) de los siguientes antibióticos.

Beta-lactámicos

Imipenema

Cefotaxima

Ceftazidima

Moxalactam

Cefoperazona.

Azlocilina.

Aminoglicósidos.

Sisomicina.

Amicacina.

Gentamicina.

Señalamos a continuación las características que más nos interesan destacar desde el punto de vista microbiológico de los antibióticos utilizados en este trabajo.

Beta-lactámicos:

La Azlocilina es una ureido penicilina derivada de la acilación de la ampicilina. Es activa frente a gérmenes Gram-positivos con la excepción de Staphylococcus productores de penicilinasas, cocos Gram-negativos como N.gonorrhoeae y N.meningitidis, y bacterias Gram-negativas como enterobacterias y P.aeruginosa y bacterias anaerobios.

Es sensible a la acción de las beta-lactamasas. El pH óptimo de actuación al igual que el de todas las penicilinas es ácido. Es estable durante meses en forma de polvo, pero una vez hidratada se descompone rápidamente permaneciendo activo como máximo una semana a 4°C. (13,93 99).

La Imipenema es la N-formimidoil-thienamicina; es activo frente a microorganismos Gram-positivos como Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, cocos Gram-negativos como N.gonorrhoeae productora de penicilinasas; también es activo frente a enterobacterias, P.aeruginosa, anaerobios como B.fragilis y algunos clostridium (13,77,79,109,114,141,-

151).

Es resistente a la acción de las beta-lactamasas tipo 1d de P.aeruginosa, debido a un cambio en el 6-alfa-hidroxietil y a la ausencia de un átomo de azufre en el anillo secundario (122).

Al igual que todas las penicilinas el pH óptimo de actuación es ácido, pero presenta la particularidad de ser activa incluso a pH 7 á 8. Su estabilidad una vez hidratada es de 24 horas a 25°C y un máximo de una semana a 4°C (108,114).

La Cefotaxima es una cefalosporina semisintética de la tercera generación de cefalosporinas, derivada del ácido 7-aminocefalosporánico que ha sufrido diversas sustituciones.

Tiene un espectro antimicrobiano más amplio que las cefalosporinas de la primera y segunda generación. Es activa frente a cocos Gram-positivos como Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae y S.pyogenes cocos Gram-negativos: Neisseria gonorrhoeae, N.meningitidis, H.influenzae, bacterias Gram-negativas como E.coli, Klebsiellas, P.aeruginosa; también es activa frente a algunas especies de Clostridium y Bacteroides, excepto Clostridium difficile y Bacteroides fragilis.

La presencia de un grupo metoxi en posición 7 le confiere resistencia a la hidrólisis de muchas beta-lactamasas producidas por bacilos Gram-negativos (29). Se mantiene activa a un pH que puede oscilar de 5 á 7. Una vez hidratada se mantiene estable durante 24 horas a 25°C. y un máximo de diez días a 4°C. Siempre ha de estar protegido de la luz, que la inactiva rápidamente (13,30,51,66,67,93,100). Al metabolizarse en el hígado produce un metabolito acetilado microbiológicamente activo, la desacetilcefotaxina.

La Cefoperazona, del grupo de las cefalosporinas, es un derivado de la piperazina.

Es activa frente a gérmenes Gram-positivos como Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, y S.pyogenes; cocos Gram-negativos: Neisseria gonorrhoeae, N.meningitidis, H.influenzae, bacilos Gram-negativos: E.coli, Klebsiellas, Salmonellas, Shigellas, Pseudomonas aeruginosa y algunas especies de Clostridium y Bacteroides.

Es resistente a la acción de las beta-lactamasas, su pH óptimo es ácido; cuando se hace alcalino se inestabiliza. Permanece estable durante meses en forma de polvo, pero una vez hidratada se descompone pudiendo permanecer 24 horas a 25°C. y un máximo de una semana a 4°C. (13,93, 94,100).

El Moxalactam es un 1-oxa-beta-lactam que se diferencia de las cefalosporinas en que el átomo de azufre en el anillo dihidrotiazidino ha sido reemplazado por el oxígeno. Es el primer antibiótico beta-lactámico totalmente sintético; no es una verdadera cefalosporina, aunque se incluye en este grupo.

Estudios "in vitro" han demostrado que tiene una actividad similar a las otras dos cefalosporinas de la tercera generación. Es activo frente a cocos Gram-positivos, como Staphylococcus aureus, Streptococcus; cocos Gram-negativos como N.gonorrhoeae, bacilos Gram-positivos como Enterobacter sp, Proteus sp, Serratia sp y P.aeruginosa.

Es resistente a la hidrólisis de beta-lactamasas de bacilos Gram-negativos. El pH óptimo de actuación es ácido. Es estable a 25°C. durante 24 horas y un máximo de 96 horas a -5°C. (6,13,64,66,93,100,153).

La Ceftazidima es una aminothiazol cefalosporina. Activa frente a gérmenes Gram-positivos Staphylococcus aureus e inactiva frente a Streptococcus faecalis y Listeria, cocos Gram-negativos; Haemophylus influenzae y bacterias Gram-negativas: E.coli, Klebsiella sp, Proteus sp, P.aeruginosa (25).

Es resistente a la acción de las beta-lactamasas. El pH óptimo de actuación al igual que todas las cefalosporinas es ácido. Es estable durante meses en forma de polvo, una vez hidratada se descompone rápidamente permaneciendo 24 horas a 25°C. y hasta una semana a 4°C. (10, 13,19,25,45,93,121).

Aminoglicósidos.

La Gentamicina aislada de Micromonospora purpúrea. Es una mezcla de sulfato de gentamicina C, gentamicina C_{1a} y gentamicina C₂. Ha sido considerada como uno de los antibióticos más eficaces en el tratamiento de las infecciones graves en los últimos diez años (64,66).

Es activa frente a cocos Gram-positivos incluido el Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis; bacilos Gram-negativos como E.coli, Proteus sp, Klebsiella sp, P.aeruginosa, no frente a Bacteroides.

Se ve afectado por enzimas presentes en la P.aeruginosa que son capaces de adenilar o acetilar el antibiótico inactivándolo. Su actividad se ve favorecida a pH alcalino, es estable en forma de polvo durante meses, pero se debe mantener en un contenedor hermético hasta su uso, una vez hidratado se mantiene estable también durante meses a 25°C. pero a temperaturas superiores a 40°C. se inactiva (57,64,66,93).

La Amicacina es un derivado semisintético de la kanamicina. Su es-

pectro de actividad antimicrobiana es parecido al de la gentamicina. Pero es más resistente a la inactivación enzimática, por presentar en su estructura química una cadena lateral que dificulta su inactivación por enzimas fosforilantes, adenilantes o acetilantes.

Al igual que todos los aminoglicósidos su pH óptimo de actuación es alcalino, es estable durante meses en forma de polvo debiendo mantenerse en un contenedor hermético con desecador hasta su utilización. Una vez hidratado es estable durante meses a 25°C. se inestabiliza a temperaturas superiores a 40°C. (57,64,65,66,93,130).

La Sisomicina. Es producida por Micromonospora inyonensis. Su estructura guarda gran parecido con la gentamicina, de la que se diferencia por la aparición de un doble enlace entre los carbonos 4' y 5'. Ha sido el primer aminoglicósido que presenta un doble enlace en su estructura, lo que parece conferirle la propiedad de ser más activo que la gentamicina (142).

Su actividad antimicrobiana "in vitro" indica que es activo frente a cocos Gram-positivos Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, bacilos Gram-negativos: E.coli, Klebsiella sp, Proteus sp y P.aeruginosa.

Es inactivada por los mismos enzimas que inactivan a la gentamicina y por uno de los dos enzimas conocidos que inactivan a la amicacina. Parece ser activa frente a muchos microorganismos resistentes a la gentamicina y la amicacina por mecanismo no enzimático (128). Actúa mejor a pH alcalino y es estable durante años en forma de polvo debiendo mantenerse en un contenedor hermético con desecador, una vez hidratado se mantiene hasta tres años a 25°C. pero a altas temperaturas se inactiva (144).

3.1.5. Aparatos de medida.

Espectofotómetro.

SPECT 20 Bausch and Lomb.

Peachímetro.

Corning pH meter 125.

Cromatógrafo de alta presión.

Water, con inyector U6K, detectores de absorbancia y de fluorescencia modelo 420 C. Provisto de Integrador.

3.2. METODOS.

3.2.1. Técnica de dilución en agar Mueller Hinton.

Hemos utilizado el método de dilución en Agar Mueller Hinton siguiendo la técnica de WASHINGTON y BARRY (146).

Se define concentración mínima inhibitoria como la más baja concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un inóculo de 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

Descripción del método de dilución en agar Mueller Hinton.

a) Preparación de las diluciones de antibióticos.

Las soluciones de antibióticos fueron preparadas a partir de una solución original, cuyas concentraciones fueron diez veces superior a las concentraciones utilizadas al final de la prueba.

Para determinar la CMI se prepararon diluciones decrecientes de antibióticos en base dos. Las concentraciones usadas se encuentran entre rangos que fueron de $0,12 \mu\text{g/ml}$ a $512 \mu\text{g/ml}$.

El cálculo para saber la cantidad de "polvo valorado" que teníamos que pesar (P) lo obtuvimos multiplicando el factor de corrección que nos indica la pureza de este antibiótico (fc), por el volumen final de la solución (Vf), por la concentración elegida del antibiótico (A) y por el volumen de la placa (VP).

$$P = (fc) \times (Vf) \times (A) \times (Vp).$$

b) Medio de cultivo.

Mueller Hinton Agar al que se incorpora la dilución del antibiótico en una proporción 9/1.

c) Preparación del inóculo.

Partimos de un cultivo puro de cada una de las cepas de referencia y de las cien cepas de P.aeruginosa que descongelamos, aislamos y mantenemos 18 horas en incubación a 37°C . Transcurrido este tiempo tomamos tres o cuatro colonias, inoculamos en un tubo con 10 ml de caldo de Mueller Hinton y lo dejamos incubar 3 ó 4 horas. Pasado este tiempo se mide su turbidez que ajustamos con la escala sulfato de Bario standard.

Esta turbidez es equivalente aproximadamente a 5×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) para E.coli y de 1×10^8 a 5×10^8 UFC para P.aeruginosa. Hacemos una dilución tomando 0,5 ml de este tubo a otro con 10 ml de agua, que será el que utilizaremos para rellenar los

pocillos del replicador de Steers (137).

d) Inoculación del medio.

Las placas de Mueller Hinton Agar conteniendo el antibiótico y las placas control sin antibiótico son inoculadas con una gota calibrada de 0,001 á 0,002 ml mediante el replicador de Steers. En cada pocillo se pone 10^4 UFC en un espacio de 5-6 mm de diámetro.

Una vez inoculadas las placas esperamos 5 ó 10 minutos para que se absorba bien la gota del inóculo en la placa con la solución de antibiótico.

e) Incubación.

Se incuban en estufa a 37°C. durante 18 horas.

f) Resultados de la medida.

La CMI representa la más baja concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

3.2.2. Técnica de dilución en cuadrado en medio sólido.

Determina si una combinación de antibióticos tiene un efecto sinérgico, indiferente, aditivo, antagónico o favorable sobre un microorganismo, siguiendo el método de dilución en cuadrado (124).

Descripción del método "dilución en cuadrado".

a) Preparación de las diluciones de antibiótico.

Las soluciones de antibióticos fueron preparadas a partir de una solución original, de concentración diez veces superior a las concentraciones requeridas.

Las concentraciones usadas se encuentran entre rangos 0,12 µg/ml a 512 µg/ml.

El cálculo del "polvo valorado" que teníamos que pesar lo obtuvimos según la fórmula:

$$P = (fc) \times (Vf) \times (A) \times (Vp).$$

b) Medio de cultivo.

Mueller Hinton Agar al que se incorpora 1 ml de betalactámico a una concentración determinada y 1 ml de aminoglicósido a una concentración determinada.

c) Preparación del inóculo.

Igual a la descrita en la CMI.

d) Inoculación del medio.

Igual a la descrita en la CMI.

e) Incubación.

Se incuban en estufa a 37°C durante 18 horas.

f) Resultados de la medida.

La CMI para cada uno de los antibióticos de la combinación se define como la mínima concentración de antibióticos betalactámico, combinada con aminoglicósido a una concentración dada capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible a ojo desnudo.

g) Interpretación de los resultados.Concentración Inhibitoria Fraccionada (FIC).

Se define como la concentración mínima de cada uno de los dos antibióticos, que tiene efecto inhibitorio cuando actúan en combinación. El valor del FIC para el betalactámico fue calculado, como la CMI de los antibióticos en combinación dividido por la CMI del betalactámico sólo (55).

$$FIC_B = \frac{CMI_{B+A}}{CMI_B}$$

El FIC para el aminoglicósido fue calculado como la CMI de los

antibióticos en combinación dividido por la CMI del aminoglicósido sólo.

$$FIC_A = \frac{CMI_{B+A}}{CMI_A}$$

La suma del $FIC_A + FIC_B$ se define como índice FIC (1036) $FIC = FIC_B + FIC_A$.

El criterio seguido por nosotros para valorar el FIC fué el de ELION (23): Cuando el valor del FIC fué igual o menor a 0,75 decimos que existe sinergia. Si es mayor a 0,75 y menor ó igual a 1 hay adición. Si está comprendido entre 1 y 2, indiferencia. Cuando es igual ó superior a 2 hay antagonismo. El efecto favorable comprende los efectos sinérgicos y aditivos (23).

3.2.3. Técnica de la curva de muerte.

Esta técnica mide la actividad bactericida de los antibióticos frente a una cepa en relación con el tiempo. El método seguido fue el de ROSENBLATT y STEWART (124) modificado.

Descripción del método de la curva de muerte.

a) Preparación de las diluciones de antibióticos.

Igual a la descrita en la CMI.

Dependiendo del comportamiento de las cepas obtenido en el estudio previo de la interacción, según la técnica de dilución en cuadrado, las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron diferentes.

En las cepas en las que una combinación de antibióticos mostró un efecto sinérgico por el estudio de interacción en medio sólido, los antibióticos fueron utilizados en concentraciones subinhibitorias en las curvas de muerte. Los betalactámicos y aminoglicósidos en combinación se utilizaron en concentraciones 4 ó 8 veces inferior a las CMI respectivas.

En las cepas en las que la combinación de antibióticos mostró efectos indiferentes en medio sólido, las concentraciones de antibióticos usadas en las curvas de muerte fueron subinhibitorias, la mitad de las CMI respectivas.

En aquellos aislamientos considerados como antagónicos, las concentraciones de antibióticos utilizadas en la curva de muerte, tanto

solos como en combinación, fué la CMI (124).

b) Medio de cultivo.

Caldo de Mueller Hinton al que se incorpora la dilución de los antibióticos en una proporción 100/1.

c) Preparación del cultivo.

Partimos de un cultivo puro de P.aeruginosa que descongelamos, aislamos y mantenemos 18 horas en incubación a 37°C. Transcurrido este tiempo, tomamos 3 ó 4 colonias, inoculamos en un tubo con 10 ml de caldo Mueller Hinton; lo dejamos incubar 18 horas a 37°C., en este momento su turbidez debe ser 10^8 UFC/ml, cuando medimos en el espectofotómetro.

Hacemos una dilución tomando 0,5 ml de este tubo, a un matraz con 100 ml de caldo Mueller Hinton, que se deja incubar 6 horas en agitación a 37°C. hasta alcanzar una turbidez de 10^9 (UFC/ml).

d) Inoculación del medio.

Tomamos 0,1 ml del caldo de cultivo previamente inoculado y lo añadimos a cada uno de los ocho matraces con 100 ml de MHB, (Fig.1).

El primer matraz lo utilizaremos como testigo del crecimiento bacteriano. Al segundo matraz (A) una vez inoculado se le añade 1 ml de el beta-lactámico estudiado, a la concentración adecuada. Esta misma maniobra tenemos que hacer con los aminoglicósidos (matraces B,C,D).

Para estudiar el comportamiento de las combinaciones también tomaremos 0,1 ml del inóculo y lo pondremos en cada uno de los tres

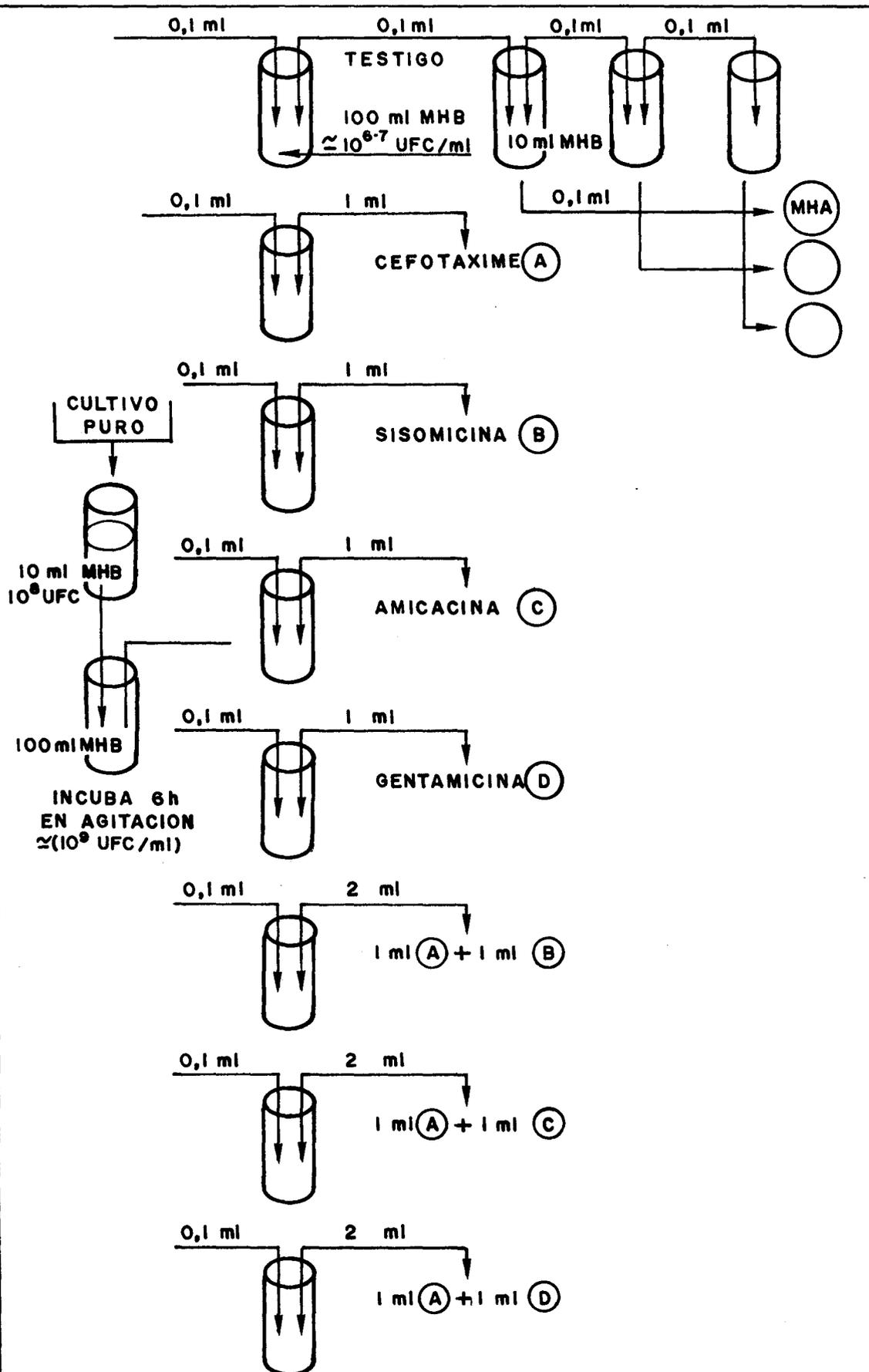


FIGURA 1.- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DEL METODO SEGUIDO PARA LA ELABORACION DE LAS CURVAS DE MUERTE.

matraces con 100 ml de MHB a los que se añadiran 1 ml de la solución de beta- lactámico más 1 ml de la solución de aminoglicósido a las concentraciones adecuadas.

Una vez inoculado el medio de cultivo, tomamos muestras a las 0,1,2,4, 8 y 24 horas para llevar a cabo el:

e) Recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para ello procedemos del siguiente modo:

Tomamos 0,1 ml del testigo, lo llevamos a un tubo con 10 ml de MHB, tras mezclarlo bien tomamos 0,2 ml que repartimos 0,1 ml en otro tubo con 10 ml de MHB y 0,1 ml en una placa de MHA, que extendemos de forma homogénea, mediante un giraplacas y asa de Digralski para que la extensión sea uniforme. Esta operación se repite dos veces más, de este modo hemos conseguido hacer diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , y 10^{-7} .

f) Incubación.

En estufa a 37°C durante 18 horas.

Tomamos alicuotas de cinco mililitros de cada uno de los matraces que utilizamos para:

Medir turbidez en el espectofotómetro.

Medir pH en el peachímetro.

Determinar los cambios morfológicos mediante tinción con Azul de metileno.

g) Tinción.

Se eligió Azul de metileno porque P.aeruginosa a veces no se tiñe bien con el Gram, además es una tinción simple, más sencilla y rápida que la anterior.

Observamos la morfología de las colonias, tamaño, elevación, superficie, aspecto, bordes, si aparece alguna modificación. Estudiamos las variaciones en su sensibilidad a los antibióticos mediante el cálculo de la CMI, tomando dos ó tres colonias aisladas, observando si existe algún cambio a lo largo del tiempo (115).

h) Interpretación de los resultados de la curva de muerte.

Según una interpretación, la sinergia se definió como una disminución de al menos 1 logaritmo del n° de (UFC) con la combinación a las 4 horas, cuando se compara con el n° de (UFC) obtenidas con el menos activo de los antibióticos solo JAWETZ (62,63). Siguiendo el criterio de NORDEN (103) se consideró que existía sinergia, cuando la reducción del n° de (UFC) provocada por los antibióticos en combinación fueron cifras de 2 ó más logaritmos superior a las obtenidas con el antibiótico más eficaz solo, medida a las 24 horas.

Indeterminado. Cuando uno solo de los antibióticos fue capaz de esterilizar el inóculo. Indiferencia cuando la acción de los dos fármacos juntos no fué mayor que la del más activo solo. Antagonismo cuando el efecto bactericida de los antibióticos fué reducido por su combinación con el otro.

El recuento del número de colonias se obtiene al contar el número de colonias que aparecen en las placas de MHA y multiplicar por la dilución de la que hemos partido.

3.2.4. Técnica de cromatografía líquida de alta presión para determinar niveles de antibióticos.

a) Aplicada a amicacina.

Para conocer las condiciones standard de trabajo tomamos muestras del medio de cultivo líquido MHB en que realizamos la curva de crecimiento y determinamos sus características.

Tomamos muestras de los matraces inoculados para determinar los niveles de antibiótico. Cuando la muestra no pudo ser procesada inmediatamente la mantuvimos en nevera a 4°C para evitar el crecimiento de la bacteria o la inactivación del antibiótico mientras no se procesaba.

Preparación de la columna de sílica gel.

Para preparar las columnas de sílica gel se lava y acondiciona el Gel de sílice (60-200 mallas) añadiéndole agua; se agita y deja sedimentar, y retiramos el sobrenadante. Se repite la operación con etanol y metanol, dejando secar el Gel.

La preparación de las columnas se lleva a cabo taponando pipetas Pasteur con lana de vidrio silanizada, se rellenan estas columnas hasta unos 4 cm con el gel de sílice que previamente ha sido tratado. Consevar a 4°C. bajo atmósfera de nitrógeno.

Agente derivatizador.

O-oftalaldehido que se obtiene disolviendo en etanol al 95% a pH 10 y añadimos 2-mercaptoetanol.

Patrones.

Solución stock 512 μg amicacina/ml de agua.

Soluciones patrones: 512,128,32,16,8 μg de amicacina/ml de caldo Mueller Hinton.

Extracción y derivatización de las muestras patrones y problemas

Se lleva a cabo en las columnas de sílica gel previamente preparadas para ello, lavamos la columna con buffer fosfato 66 mM a pH 9. Posteriormente se mezcla 1 ml de la muestra con 1 ml de buffer fosfato a pH 9 y se añade la mezcla a la columna.

Lavamos dos veces el tubo donde estaba la muestra con 1 ml de agua, cada vez. Este agua también se adiciona a la columna. El eluido total 4 ml se descarta. Añadimos a la columna 1 ml del agente derivatizador y 2 ml de etanol (95% a pH 10).

El eluido, 3 ml, conteniendo la amicacina derivatizada, se agita en un Vortemixed y se calienta a 50°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se introduce en hielo durante 3-4 minutos, filtramos inmediatamente a través de un filtro Millipore (0,6 μm).

El filtrado se mantiene en hielo y en la oscuridad hasta que se realiza la cromatografía.

Condiciones cromatográficas.

- Volumen de inyección: 25 μ l.
- Fase Móvil: Metanol/acetonitrilo/agua (60:5:35),conteniendo 2g. EDTA/1.
- Flujo 1 ml/min.
- Columna: Ubondapack C₁₈ + Precolumna de C₁₈ Ccrasil.
- Detector: Fluorescencia: Filtro de excitación: 340 nm, Filtro emisión: 425 nm (89,90).

<u>Atenuación</u>	<u>Concentraciones.</u>
8	10 μ g/ml
16	10-5 μ g/ml
32	5 μ g/ml.

Integrador.

Velocidad del papel: 0,25 cm.min⁻¹.

ATT: 2⁸.

Th: 6

Pw: 0,16 para concentraciones superiores a 5 μ g/ml.

0,64 para concentraciones inferiores a 5 μ g/ml.

Tr: 8,2 + 0,2 min.

b) Aplicada a sisomicina.

La preparación de las muestras y de las columnas de sílica Gel es igual que para amicacina, con la excepción de que la altura de las misma debe ser de 2 cm.

Agente derivatizador.

O-oftalaldehido disuelto en metanol al que hemos añadido ácido bórico a pH 10,4 y 2-mercaptoetanol. Conservar a 4°C. bajo atmósfera de nitrógeno.

Patrones.

- Soluciones stock: 1024 ug. de sisomica/ml de agua.
- Soluciones patrones: agua: 25,5,1 µg/ml.
- Soluciones patrones MHB: 5,5,1, µg/ml.

Extracción y derivatización de las muestras patrones y problemas

Este tratamiento se lleva a cabo en las columnas de sílica gel previamente preparadas.

Lavamos la columna con 1 ml de agua, se adiciona 1 ml de muestra. Lavamos dos veces el tubo que contenía la muestra con 1 ml de agua cada vez. Este agua se añade a la columna. El eluido total 3 ml se descarta.

Adicionamos 1 ml de agente derivatizador seguido de 2 ml de isopropanol. El eluido 3 ml, conteniendo sisomicina derivatizada se agita en el Vortemixed y se calienta a 63°C, durante 10 minutos.

Después se introduce en hielo y enfría durante 3-4 minutos. Filtramos inmediatamente a través de un filtro Millipore FH (0,6 µm). El filtrado se mantiene en frío y en la oscuridad hasta que se cromatografía.

Condiciones de trabajo.

Igual que para amicacina.

Condiciones cromatográficas.

- Volumen de inyección: 100 μ l.
- Fase Móvil: Metanol/Agua (72:28) + 1,8 g.EDTA/litro.
- Flujo: 2 ml/min.
- Columna: Ubondapack C₁₈ + Precolumna de C₁₈ Corasil.
- Detector: Fluorescencia. Filtro de excitación: 340 nm, Filtro emisión: 425 nm.
- Atenuación del fluorímetro: 32 para sisomicina.

Integrador.

- Velocidad del papel: 0,25 cm.min⁻¹.
- ATT: 2⁸.
- Th: 6.
- Pw: 0,64.
- Tiempo de retención: 10,30 \pm 0,50 minutos para sisomicina.

c) Aplicada a gentamicina.

Igual sistemática que para sisomicina. La única diferencia son los tiempos de retención.

<u>Tiempos de retencion</u>	<u>Componentes.</u>
4,15 \pm 0,15	C ₁ .
7,75 \pm 0,25	C _{1a} .
9,60 \pm 0,30	C ₂ .

Para cuantificar hay que tener en cuenta la composición del preparado comercial de gentamicina:

28,3% Gentamicina C_1 .

34,6% Gentamicina C_{1a} .

37,1% Gentamicina C_2 .

d) Aplicada a cefotaxima y ceftazidima.

El procesamiento de la muestra es igual al seguido con amicacina.

El método de calibrado es el patrón externo.

Tomaremos como referencia aquella concentración que pensemos que está más próxima a los niveles esperados.

Tratamiento de las muestras.

Se hizo añadiendo acetonitrilo en la proporción 1:1, después se centrifugó durante cinco minutos a 12.000 x g y filtro (118).

Condiciones cromatográficas.

- Volumen de inyección: 20 μ l.
- Fase Móvil: agua/metanol (85:15) más 1% de ácido acético. Flujo: 1,5 ml/min.
- Columna: Ubondapack C_{18} + Precolumna de C_{18} Corasil.
- Detector: UV 254 nm. AUFS: 0,005.
- ATT: 2² PKWD: 0,16 THRSH: 0
- Tr (CTX): 18.5 \pm 0,5 minutos.

3.2.5. Métodos estadísticos.

Se ha realizado estudio descriptivo de las variables, análisis de regresión, entre dos factores y análisis de la varianza (126,147).

Mediante el análisis de regresión se han valorado las posibles relaciones lineales entre:

- a) Número de UFC y tiempo.
- b) pH de las muestras y tiempo.
- c) Turbidez de las muestras y tiempo.
- d) Niveles de antibióticos y tiempo.
- e) Número de UFC y turbidez.
- f) Número de UFC y niveles de antibióticos.

El análisis de la varianza se ha realizado sobre dos factores, siendo las variables dependientes: El número de UFC, pH y turbidez, y las variables independientes, el tipo de antibiótico (introduciendo un grupo testigo, sin tratamiento) y el tiempo (horas 0,1,2,4,8,-24). Los resultados obtenidos se han expresado en los casos que hubo diferencias mediante un sistema de cuadrículas. En los laterales de dicha cuadrícula se disponen los grupos comparados, siguiendo siempre un orden de menor a mayor valor de la media, de abajo arriba y de izquierda a derecha. Los cuadros en blanco indican que existen diferencias significativas entre las medias de los grupos que intersectan a un nivel de $p < 0,05$ (Fig.2).

Para la valoración de los resultados se ha utilizado el programa estadístico SPSS de un ordenador Perkin-Elmer del Centro de Cálculo de la Universidad de Málaga y otros programas elaborados por la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de Málaga.

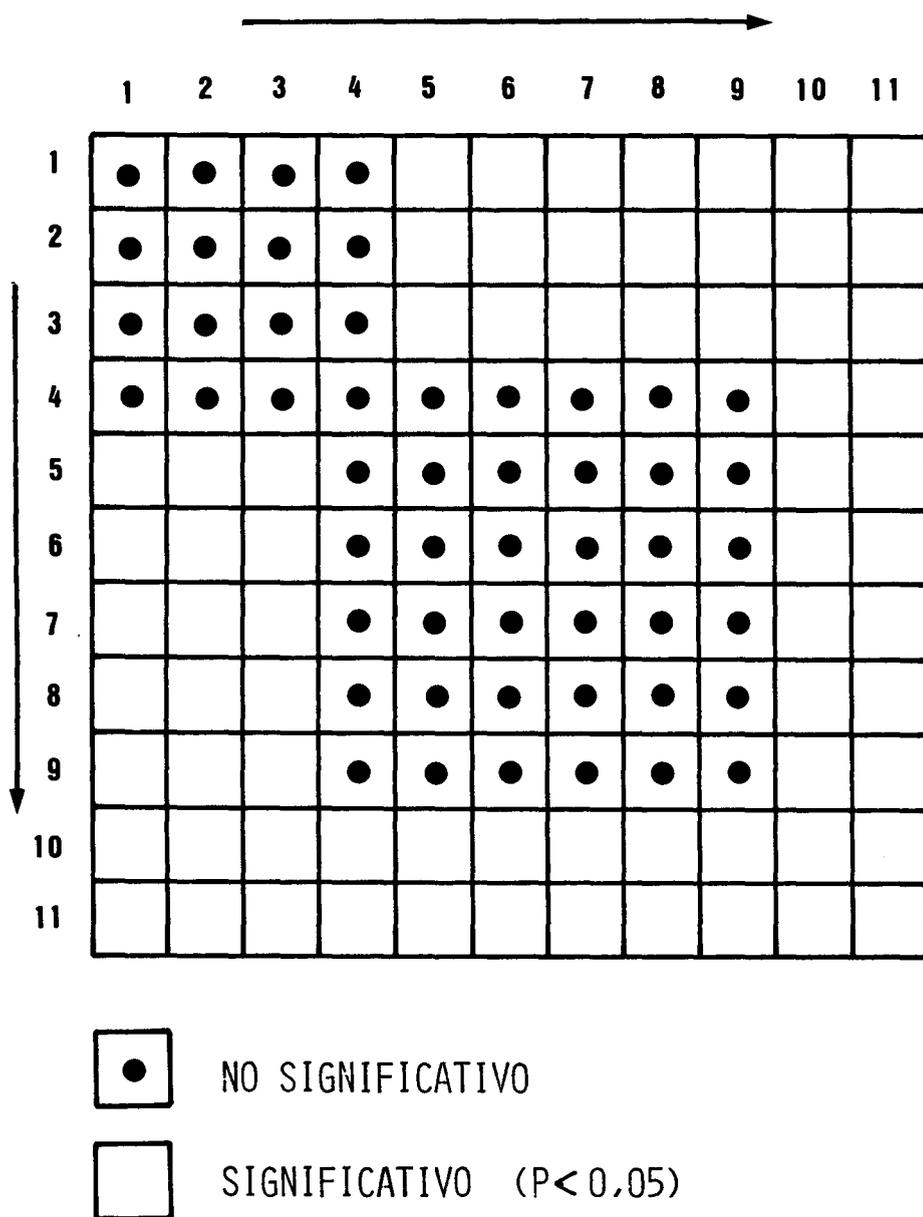


FIGURA 2.- DIAGRAMA UTILIZADO PARA LA REPRESENTACION DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LAS MEDIAS EN EL ANALISIS DE LA VARIANZA, ENTRE GRUPOS. LAS FLECHAS SEÑALAN EL ORDEN DE LAS MEDIDAS. (EJ. $5 > 4$). EL CUADRO BLANCO INDICA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS.

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cien cepas de P.aeruginosa frente a: imipenema,cefotaxima,ceftazidima, moxalactam,cefoperazona, azlocilina, sisomicina, amicacina y gentamicina.

Los resultados de la CMI están expresados en la tabla I, donde podemos apreciar que de todos los antibióticos ensayados los más activos fueron: imipenema,ceftazidima,cefotaxima y sisomicina.

El beta-lactámico más activo fue imipenema, con CMI₅₀ 1 µg/ml y CMI₉₀ 4 µg/ml, seguido de ceftazidima con CMI₅₀ 2 µg/ml y CMI₉₀ 4 µg/ml.

Ambos mostraron unos valores de CMI muy similares. La actividad de cefotaxima y azlocilina sobre P.aeruginosa ocupa un lugar intermedio dentro del grupo de antibióticos betalactámicos estudiados, sus CMI₅₀ fueron 4 µg/ml y 8 µg/ml respectivamente, mientras que las CMI₉₀ fueron de 32 y 128 µg/ml respectivamente.

Cefoperazona y moxalactam mostraron la menor actividad, ambos tuvieron iguales valores de CMI₅₀ 16 µg/ml y CMI₉₀ 64 µg/ml.

La actividad de los tres aminoglicósidos ensayados (sisomicina,amicacina y gentamicina) fué muy parecida. El más activo, sisomicina, tuvo CMI₅₀: 4 µg/ml y CMI₉₀: 128 µg/ml, los otros dos antibióticos se diferenciaron en una dilución en la CMI₅₀, que fué para gentamicina de 8 µg/ml y para amicacina de 16 µg/ml, mientras que ambos tuvieron la misma CMI₉₀ 128 µg/ml.

TABLA I: PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS INHIBIDAS A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ANTIBIOTICOS.

CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS

Antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>512	CMI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	% DE CEPAS INHIBIDAS														
Sisomicina	2	8	9	13	30	65	73	80	83	88	89	91	100	4	128
Amicacina	-	-	-	2	5	9	29	64	76	88	97	98	100	16	128
Gentamicina	2	4	5	11	14	32	62	79	84	85	90	91	100	8	128
Cefoperazona	-	-	1	3	7	19	31	77	84	90	94	94	100	16	64
Azlocilina	-	-	2	4	11	37	64	75	82	87	91	99	100	8	128
Ceftazidima	-	-	4	18	31	87	95	95	96	97	97	97	100	2	4
Cefotaxima	2	-	8	14	24	55	74	85	100	-	-	-	-	4	32
Moxalactam	-	-	1	3	4	10	15	77	85	99	100	-	-	16	64
Imipenema	-	-	7	51	86	99	100	-	-	-	-	-	-	1	4

4.2. RESULTADOS DE LA INTERACCION DE ANTIBIOTICOS.

4.2.1. Resultados con la técnica de dilución en cuadrado.

Se determinaron las interacciones de los antibióticos beta--lactámicos: cefotaxima, moxalactam, azlocilina, ceftazidima, cefoperazona, imipenema y aminoglicósidos: gentamicina, amicacina y sisomicina, entre sí frente a las 100 cepas de P.aeruginosa.

Los resultados obtenidos de la interacción de cada uno de los antibióticos junto con el índice FIC se recogen en la tabla II.

Las combinaciones de betalactámicos con amicacina produjeron efectos sinérgicos mayores que cuando aquéllos se asociaban a otro tipo de aminoglicósidos. El efecto sinérgico máximo se obtuvo por la combinación de moxalactam con amicacina, produciendo inhibición del crecimiento en el 93% de las cepas estudiadas. El efecto sinérgico mínimo se observó combinando la cefoperazona con sisomicina produciendo inhibición en sólo el 27% de las cepas estudiadas.

Las combinaciones de betalactámicos con sisomicina produjeron efectos de adición en más del 10% de las cepas, mientras que cuando aquéllos se combinaron con amicacina ese efecto se manifestó en menos del 10% de las cepas. El mayor efecto aditivo se obtuvo combinando imipenema con gentamicina que se observó en un 25% de las cepas. El menor efecto aditivo se produjo en las combinaciones de moxalactam con gentamicina y amicacina, y de cefotaxima con amicacina, que se observó sólo en un 3% de las cepas estudiadas.

El mayor efecto de indiferencia se produjo con la combinación de cefoperazona más sisomicina, (en el 33% de las cepas). El menor

efecto indiferente se obtuvo en el 3% de las cepas tratadas con las combinaciones de moxalactam con amicacina e imipenema con amicacina.

El mayor efecto antagónico se produjo con la combinación de cefoperazona más gentamicina; se observó en el 17% de las cepas.

No se produjo ningún antagonismo cuando las cepas fueron tratadas con las combinaciones de moxalactam más amicacina y moxalactam más gentamicina.

Algunas veces no fué posible valorar la interacción entre estos antibióticos, por ofrecer unos resultados no interpretables en estos términos.

La imposibilidad de valorar la interacción fué más frecuente cuando P.aeruginosa fué tratada con cefotaxima más sisomicina y afectó al 9% de las cepas. En los demás casos este efecto se detectó con escasa frecuencia.

El mayor efecto favorable, se observó en la combinación moxalactam con amicacina, que se produjo en el 96% de las cepas. El menor efecto favorable con la combinación de cefoperazona más sisomicina, sólo se produjo en el 44% de las cepas.

TABLA II: RESULTADOS DE LA INTERACCION DE ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS Y AMINOGLICOSIDOS FRENTE A 100 CEPAS DE P.AERUGINOSA EXPRESADOS EN INDICE DE FIC. (*).

Antibióticos	Sinergia FIC ≤ 0,75	Adición 0,75 < FIC < 1	Nº de cepas inhibidas		No valorable	Efecto favorable Sinergia + Adición	
			Indiferencia FIC = 1	Antagonismo FIC > 1			
GNT +	CTX	70	12	10	7	1	82
	MOX	86	3	10	0	1	89
	AZL	68	6	13	6	7	74
	CTZ	82	7	8	2	4	89
	CFP	33	14	32	17	1	47
	IMP	57	25	14	3	1	82
AMC +	CTX	86	3	9	3	1	89
	MOX	93	3	3	0	1	96
	AZL	85	5	5	4	1	90
	CTZ	88	7	4	0	1	95
	CFP	78	5	13	3	1	83
	IMP	82	9	3	5	1	91
SIS +	CTX	64	11	15	9	9	75
	MOX	76	11	8	4	1	87
	AZL	70	11	7	5	7	81
	CTZ	75	13	9	2	1	88
	CFP	27	17	33	16	7	44
	IMP	80	12	5	2	1	92

(*) Los datos numéricos representan % de una determinada interacción.

4.2.2. Resultados con la curva de muerte en medio líquido.

4.2.2.1. Efectos de las combinaciones de cefotaxima.

a) Estudio sobre la cepa 25.

Estudiamos las curvas de muerte de la cepa 25 de P.aeruginosa frente al antibiótico betaláctamico cefotaxima y los aminoglicósidos sisomicina, ampicacina y gentamicina, solos y en combinación con aquel.

Los valores de las CMI de los antibióticos ensayados sobre esta cepa y el índice FIC para las combinaciones betalactámicos y aminoglicósidos se exponen a continuación:

<u>Antibióticos</u>	<u>CMI ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>Antibióticos</u>	<u>Indice FIC</u>
CTX	32	CTX+SIS	0,5
SIS	1024	CTX+AMC	0,18
AMC	128	CTX+GNT	0,25
GNT	1024		

A partir de los valores de las CMI y FIC señalados anteriormente se deduce que la cepa utilizada era resistente a todos ellos, pero la interacción de los mismos presentó siempre valores muy sinérgicos, sinergia heteroérgica.

Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas para hacer la curva fueron:

CTX	SIS	AMC	GNT	CTX - SIS	CTX - AMC	CTX - GNT
16	512	64	512	4 - 128	4 - 16	4 - 128

De los resultados del recuento del número de colonias (Tabla III) y de su representación gráfica (Figs.3,4 y 5), destacamos: El testigo tuvo una primera fase de latencia seguida de una fase de crecimiento logarítmico, hasta la octava hora, a partir de este momento el crecimiento fué constante hasta el final.

Frente a cefotaxima (Figs.3,4,5) (Tabla III) la cepa mantuvo un crecimiento constante pero siempre inferior hasta en dos logaritmos al testigo sin antibiótico en las primeras ocho horas, igualándose al mismo a las veinticuatro horas.

El efecto de la sisomicina (Fig.3) (Tabla III) sobre la cepa problema pone de manifiesto una disminución del crecimiento bacteriano de tres logaritmo con respecto al testigo desde el inicio hasta las cuatro horas, recreciendo de forma progresiva en el transcurso del tiempo.

El efecto de la combinación de cefotaxima más sisomicina (Fig.3) (Tabla III) fué una disminución en el número de unidades formadoras de colonias similar al obtenido con el aminoglicósido sólo pero que se manifiesta hasta la octava hora, donde fué máximo, recreciendo la cepa a partir de este momento y apareciendo un número incontable de colonias a las veinticuatro horas, siendo igual al testigo sin antibiótico.

El efecto de la amicacina (Fig.4) (Tabla III) nos indica una disminución del número de unidades formadoras de colonia durante las primeras horas, manteniéndose constante a partir de este momento hasta el final.

La combinación cefotaxima más amicacina (Fig.4)

(Tabla III) sobre la cepa 25 se manifestó por una disminución del número de unidades formadoras de colonia semejante al obtenido con el aminoglicósido sólo en las dos primeras horas, manteniendo un crecimiento constante desde este momento hasta el final.

El comportamiento de la cepa frente a gentamicina (Fig.5) (Tabla III) se manifestó también por una disminución progresiva del número de unidades formadoras de colonia con respecto al testigo hasta el final del estudio en donde el crecimiento fué constante.

La combinación cefotaxima más gentamicina (Fig. 5) (Tabla III) sobre la cepa problema dió lugar a una disminución en el número de unidades formadoras de colonias idéntico al obtenido con el aminoglicósido sólo, en la primera hora, manteniéndose constante a partir de este momento hasta que terminó el experimento.

Morfología de las colonias.

Se observaron colonias grandes convexas y brillantes, de extremos redondeados, color verdoso y olor característico a manzana. Esta morfología de las colonias en las placas fué constante durante las 24 horas del estudio, frente a todos los antibióticos, solos y en combinación.

Morfología bacteriana.

El aspecto morfológico que presentaban las bacterias (Tabla IV) de las muestras tomadas del testigo no tratado con antibióticos, en la tinción con Azul de metileno y observadas al microscopio óptico, con objetivo de 100x, fué de bacilo pequeño de extremos redondeados, imagen típica de P.aeruginosa que se mantuvo durante las

24 horas de la curva de muerte.

La aplicación de cefotaxima sobre esta cepa 25dió lugar a la aparición de esferoplastos desde la primera hora hasta el final. Estos se manifiestan como bacilos de distinta morfología, unos pequeños, otros alargados y más gruesos, presentando zonas ensanchadas que se tiñen más intensamente (Figs.6,7).

Por el efecto de la sisomicina aparecieron bacilos con morfología característica de P.aeruginosa, sólo a la 1,8 y 24 horas, algunos aumentados de grosor, aunque nunca pudimos detectar la existencia de esferoplastos.

Cuando la cepa fué tratada con cefotaxima más sisomicina observamos bacilos con las mismas características morfológicas del testigo a la 1,2,4 y 24 horas.

El efecto de amicacina y sus combinaciones con cefotaxima fué de inhibición total del crecimiento bacteriano, por ello en las muestras tomadas no pudimos observar bacterias. Sólo se detectó crecimiento a las 2 horas cuando la cepa fue tratada con amicacina.

El aspecto morfológico de las bacterias tratadas con gentamicina en la tinción fué de bacilo idéntico al testigo sin antibiótico a la 1,2 y 4 horas. Después no pudimos observar ningún crecimiento.

Cuando la cepa fué tratada con cefotaxima más gentamicina sólo observamos bacilos pequeños y de extremos romos como en la muestra tomada en la primera hora de incubación.

Sensibilidad.

Los antibióticos ensayados en esta curva de muerte, sólo y en combinación, mantuvieron sus valores originales de CMI durante todo el intervalo de tiempo en el que hicimos el experimento. (Tabla V).

Turbidez.

Observamos que la turbidez (Tabla VI) de la cepa 25 de P.aeruginosa y de ésta tratada con cefotaxima fué aumentando paralelamente al número de unidades formadoras de colonia con el tiempo.

Cuando la cepa fué tratada con aminoglicósidos solos o en combinación con cefotaxima, el aumento de turbidez fué muy escaso, oscilando de 0,15 a 0,20 unidades. No existiendo correlación entre número de UFC y turbidez cuando la cepa fué tratada con sisomicina o cefotaxima más sisomicina.

Valores del pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de medir el pH en la curva de muerte están expresados en la Tabla VII. Podemos afirmar que este se mantuvo en sus valores originales. El aumento máximo fué de ocho décimas cuando la cepa creció como testigo sin antibiótico.

El pH de la cepa tratada con cefotaxima aumentó sólo en cuatro décimas a las 24 horas.

El pH del medio de cultivo con los aminoglicósi-

dos sisomicina, amicacina y gentamicina, disminuyó con respecto a los valores originales entre tres y doce centésimas. En las combinaciones de cefotaxima más aminoglicósidos, el pH aumentó siempre con respecto al valor inicial, entre un rango de once décimas para cefotaxima más amicacina y dos centésimas para los dos restantes.

Determinación de los niveles de antibióticos por -
Cromatografía líquida de alta presión.

Los resultados obtenidos en la valoración de las concentraciones de antibióticos medidos por cromatografía líquida de alta presión en el medio de cultivo se recogen en la Tabla VIII. Como se puede observar las concentraciones de todos los antibióticos estudiados fueron decreciendo de forma gradual a lo largo de las 24 horas.

El porcentaje de reducción (Tabla IX) para cefotaxima fué 51,3%. Para los aminoglicósidos sisomicina y gentamicina fué 28%, amicacina tuvo el porcentaje de reducción máximo 100%.

En las combinaciones de cefotaxima más aminoglicósidos los niveles de cefotaxima fueron inferiores a los encontrados cuando se administró sola, lo contrario ocurrió con los aminoglicósidos.

Los porcentajes de reducción de la concentración inicial de cefotaxima en combinación con sisomicina fueron de 45% y 68,75% respectivamente. Los de cefotaxima más amicacina fueron de 30% y 100% respectivamente. Y los de cefotaxima más gentamicina fueron de 40% y 68,75% respectivamente.

TABLA III: RECuento del número de bacterias a lo largo de la curva de muerte en la cepa 25.

	TIEMPO (Horas)					
	0	1	2	4	8	24
Testigo	2×10^5	$2,4 \times 10^5$	1×10^6	1×10^7	1×10^9	1×10^9
Cefotaxima	2×10^5	$1,7 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	1×10^9
Sisomicina	2×10^5	$1,5 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	6×10^5	1×10^9
CTX+SIS	2×10^5	$6,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	1×10^2	1×10^9
Amicacina	2×10^5	1×10^4	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTX+AMC	2×10^5	3×10^3	1×10^3	1×10^2	1×10^2	1×10^2
Gentamicina	2×10^5	$1,8 \times 10^4$	1×10^4	$1,3 \times 10^4$	8×10^3	1×10^2
CTX+ GAT	2×10^5	$1,8 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2

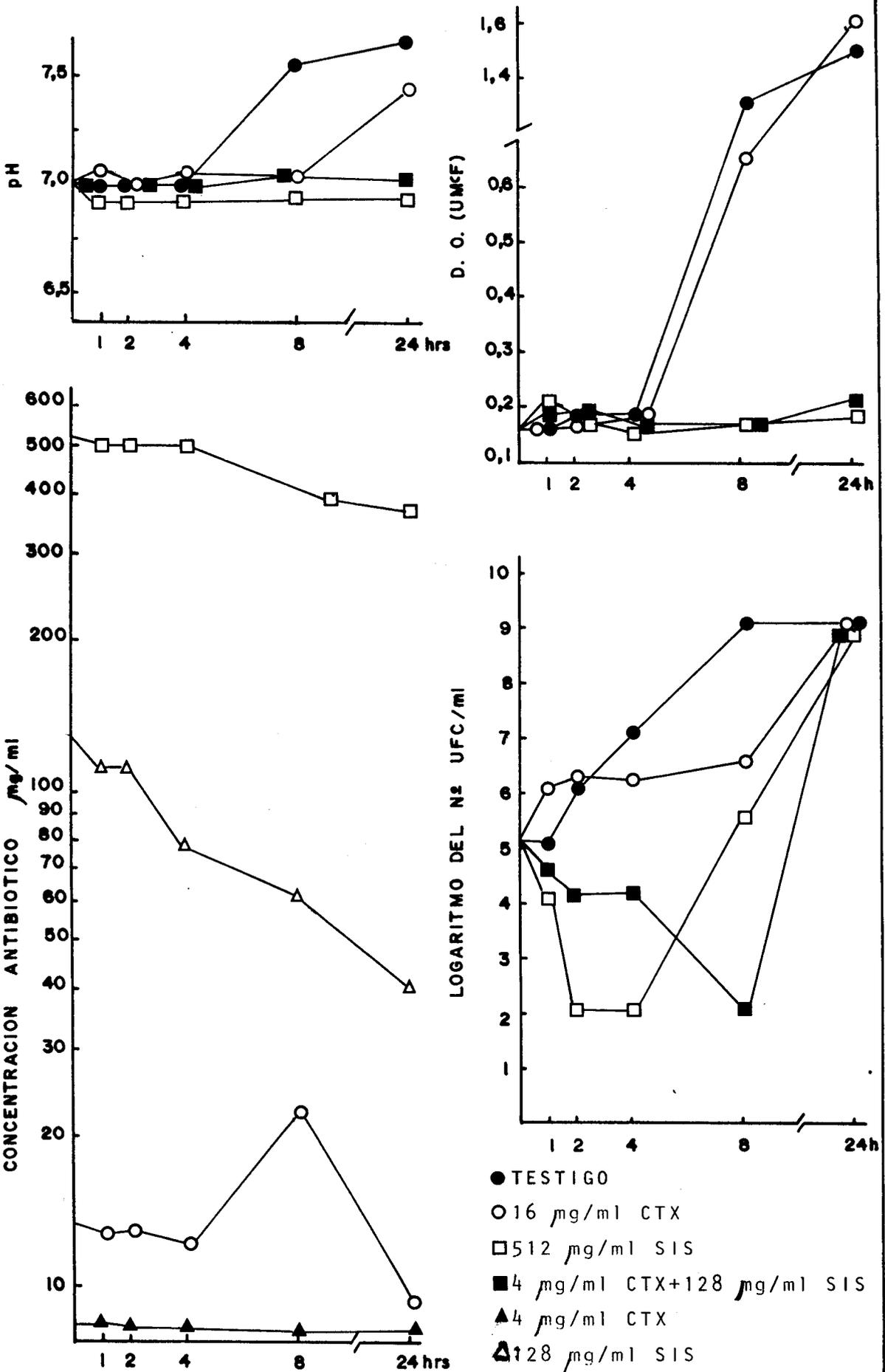


FIGURA 3.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 25
P. aeruginosa

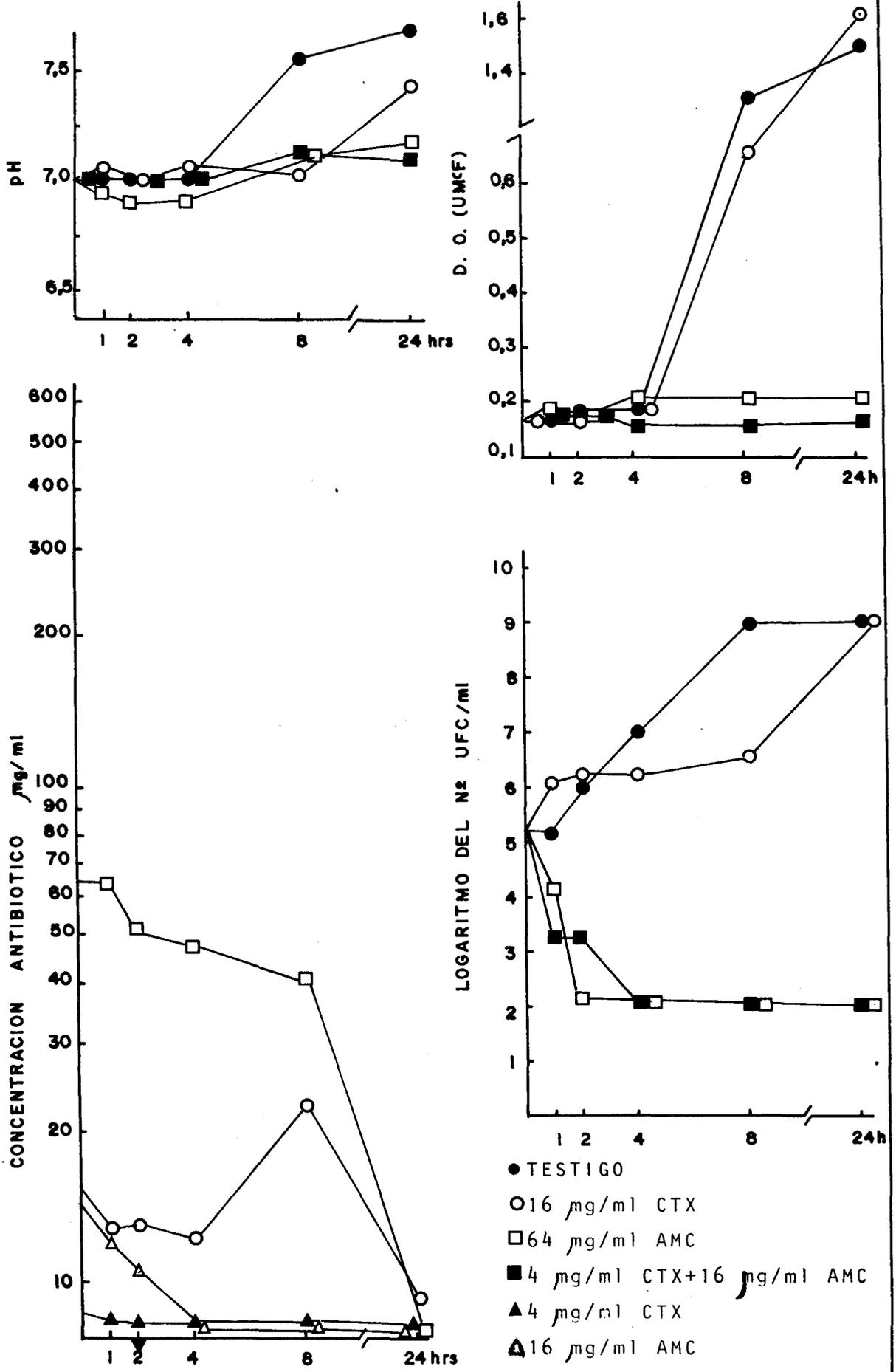


FIGURA 4.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 25
P. aeruginosa

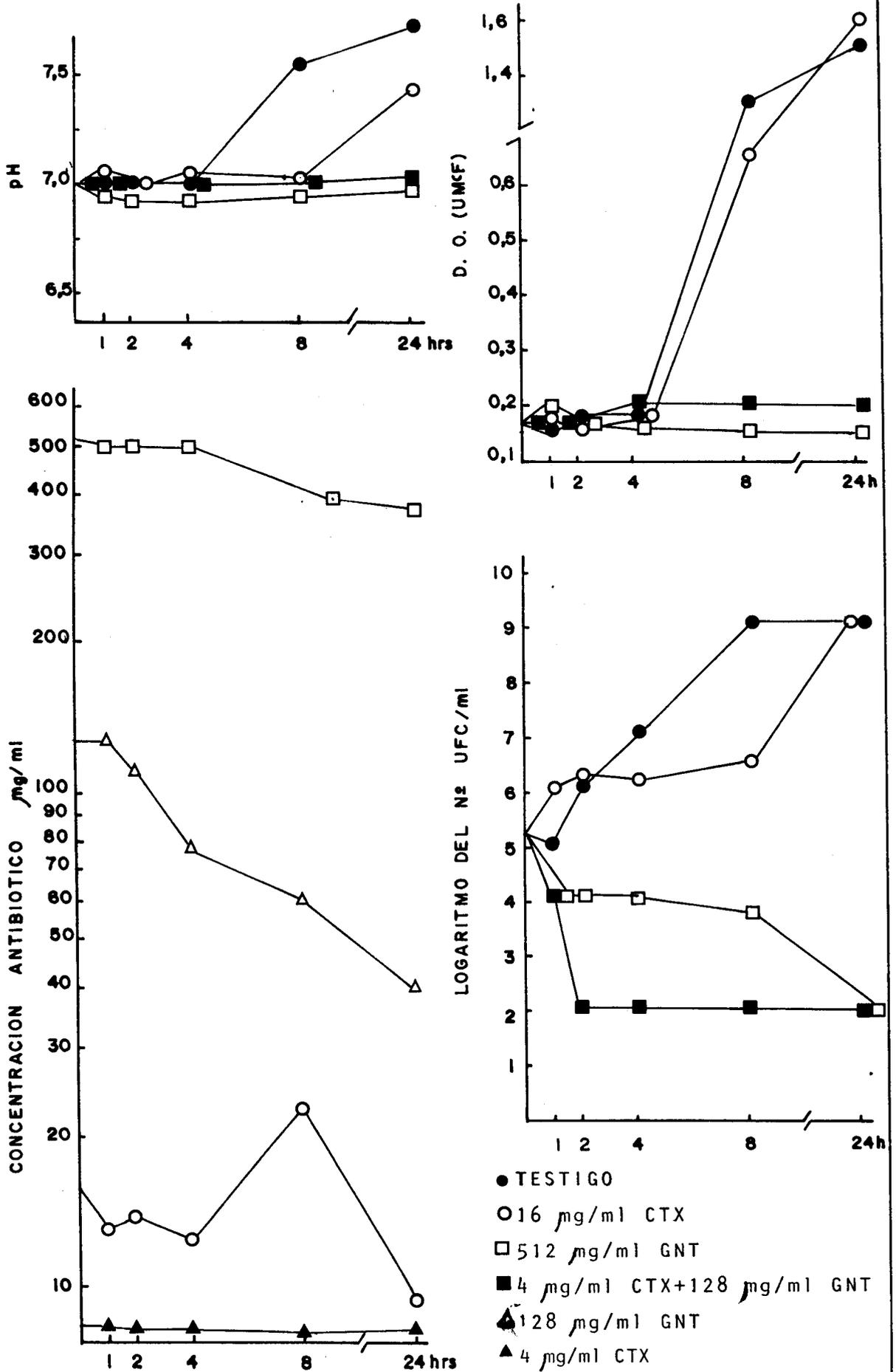


FIGURA 5.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 25
P. aeruginosa



Fig. 6. Alteración de la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* (100x) por la acción de antibióticos beta-lactámicos - (1/4 de su CMI)



Fig.7. Alteración de la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* (100x) por la acción de antibióticos beta-lactámicos - (1/4 de su CMI)

TABLA IV: RESULTADOS DE LA TINCION DE LA CEPA 25.

Tiempo (horas)	Testigo	ANTIBIOTICOS						
		CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	BGN	-	-	-	-	-	-	-
1	BGN	-	BGN	-	BGN	BGN	-	BGN
2	BGN	Esf	-	-	BGN	BGN	-	-
4	BGN	Esf	-	BGN	BGN	BGN	-	-
8	BGN	Esf	BGN	-	-	-	-	-
24	BGN	Esf	BGN	-	-	BGN	-	-

BGN: Bacilos Gram negativos

Esf: Esferoplastos

(-): No se observan bacterias teñidas

TABLA V: VALORES DE CMI ($\mu\text{g/ml}$) A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25.

Antibióticos	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Cefotaxima	32	32	32	32	32	32
Ceftazidima	4	4	4	4	4	4
Sisomicina	1024	1024	ND	ND	1024	1024
Amicacina	128	128	ND	ND	ND	ND
Gentamicina	512	512	512	512	512	ND

ND: No detectable por falta de crecimiento

TABLA VI: VALORES DE TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25 (en uM^{CF}).

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1	0,16	0,16	0,21	0,18	0,19	0,19	0,18	0,17
2	0,18	0,16	0,16	0,18	0,15	0,19	0,17	0,16
4	0,18	0,18	0,15	0,20	0,16	0,19	0,15	0,20
8	1,35	0,65	0,16	0,20	0,15	0,16	0,15	0,20
24	1,55	1,60	0,19	0,20	0,15	0,22	0,16	0,20

uM^{CF}: Unidad de Mac Farland

TABLA VII: VALORES DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	7	7	6,94	7,01	6,97	7	7	7
1	7	7,10	6,85	6,85	6,92	7	7	7
2	7	7,01	6,84	6,90	6,93	7	7	7
4	7	7,10	6,84	6,90	6,92	7	7	7
8	7,6	7,05	6,87	7,13	6,87	7,05	7,15	7,05
24	7,8	7,41	6,82	7,16	6,94	7,02	7,11	7,02

TABLA VIII: CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$) EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	CTX	DCTX*	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	15,7	3598, 4	512	64	504	3,4 128	4 14	3 128
1	13	4,1	500	64	500	3 110	3,8 12,14	2,6 128
2	13,3	-	500	50,7	500	2,4 110	3,2 10,5	2,5 110
4	12,2	-	500	47,6	500	2,4 78	3 1,9	2,3 78
8	22,7	-	380	40,4	380	1 62	3 1,6	1,6 62
24	7,8	-	368	-	368	2,2 40	2,8 -	2,4 40

DCTX* : Desacetil-cefotaxima, que se detectó en el primer período.

TABLA IX: PORCENTAJES DE REDUCCION DE LAS CONCENTRACIONES INICIALES DE ANTIBIOTICOS A LAS 24 HORAS EN LAS TRES CEPAS.

Antibióticos	Cepas	25	32	85
CTX		51,3	47,2	60
SIS		27,8	58,9	100
AMC		100	100	31,5
GNT		28,13	94.38	ND
CTX+SIS		45-68,75	44,3-25	51-100
CTX+AMC		30-100	30-100	34-35,95
CTX+GNT		40-68,75	36,75-74	53-ND

b) Estudio sobre la cepa 32.

Estudiamos las curvas de muerte de la cepa 32, de P.aeruginosa frente a los antibióticos: Betaláctamico, cefotaxima y los aminoglicósidos sisomicina, ampicacina y gentamicina, solos y en combinación con aquel.

Los valores de las CMI de los antibióticos ensayados sobre la cepa y el índice FIC para las combinaciones betalactámicos y aminoglicósidos se exponen a continuación:

<u>Antibióticos</u>	<u>CMI (µg/ml)</u>	<u>Antibióticos</u>	<u>Indice FIC</u>
CTX	32	CTX+SIS	0,53
SIS	4	CTX+AMC	0,12
AMC	64	CTX+GNT	0,5
GNT	16		

A partir de los valores de la CMI y FIC señalados anteriormente se deduce que esta cepa era sensible a sisomicina y resistente a los demás antibióticos ensayados, pero la interacción de los mismos fué siempre sinérgica.

Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos (µg/ml) utilizadas para hacer la curva de muerte fueron:

CTX	SIS	AMC	GNT	CTX - SIS	CTX - AMC	CTX - GNT
16	2	32	8	4 - 0,5	4 - 8	4 - 2

De los resultados del recuento del número de colonias (Tabla X) y su representación gráfica (Figs.8,9 y 10) destacamos: El testigo tuvo una primera fase de latencia, seguida de una fase de crecimiento logarítmico, hasta la cuarta hora, desde este momento el crecimiento se hizo constante hasta el final del estudio.

Frente a cefotaxima (Figs.8,9 y 10) (Tabla X) la cepa aumentó el número de unidades formadoras de colonias en un logaritmo en la primera hora, manteniéndose en este valor (inferior en tres logaritmos con respecto al testigo sin antibiótico) e igualándose al mismo a las 24 horas.

El efecto de sisomicina (Fig.8) (Tabla X) sobre la cepa estudiada nos pone de manifiesto una inhibición del crecimiento bacteriano, mantenido desde la primera hora hasta el último recuento que se hizo a las 24 horas.

La combinación cefotaxima más sisomicina (Fig.8) (Tabla X) se observó una disminución progresiva en el número de unidades formadoras de colonias, hasta 8 horas, donde fué máximo, recreciendo la cepa a partir de este momento y apareciendo un número incontable de colonias (al final del estudio) igual al testigo sin antibiótico.

El efecto de la amicacina (Fig.9) (Tabla X) fué idéntico al de sisomicina.

La combinación cefotaxima más amicacina (Fig.9) (Tabla X) sobre esta cepa 32 se manifestó por una disminución del número de unidades formadoras de colonias en la primera hora, manteniendo desde este momento un crecimiento constante, igual que el aminoglicósido sólo.

El comportamiento de la cepa frente a gentamicina (Fig.10) (Tabla X) se manifestó por una disminución progresiva del crecimiento bacteriano con respecto al testigo sin antibiótico, manteniendo un crecimiento constante desde la cuarta hora hasta el final.

La combinación cefotaxima más gentamicina (Fig. 10) (Tabla X) dió lugar a una disminución en el número de unidades formadoras de colonias, similar al obtenido con el aminoglicósido sólo, siendo máximo a las 8 horas. Posteriormente recreció la cepa y apareció un número de colonias al final del estudio igual al que teníamos al comienzo del estudio.

Morfología de las colonias.

La morfología de las colonias en las placas no experimentó ninguna modificación durante las 24 horas de la curva de muerte, manteniéndose el aspecto típico de P.aeruginosa, colonias grandes, convexas y brillantes, de color verdoso y olor a manzana.

Morfología bacteriana.

El aspecto morfológico de la bacterias (del testigo sin antibiótico) en la tinción con Azul de metileno y observado al microscopio óptico, con objetivo de 100x, fué de bacilo pequeño de extremos redondeados, imagen típica de P.aeruginosa que se mantuvo en todas las muestras tomadas durante las 24 horas de la curva de muerte.

Por el efecto de cefotaxima sobre la cepa 32, se observó desde la segunda hora hasta el final de la curva de muerte, bacilos largos con zonas aumentadas de grosor y más intensamente teñidas, esta morfología es típica de esferoplastos.

Cuando la cepa fué tratada con sisomicina en las tinciones no se observó crecimiento bacteriano.

En las tinciones realizadas de la cepa tratada con cefotaxima más sisomicina, se observó a las 1,2,4 y 24 horas, bacilos semejantes al testigo, algunos de mayor grosor, pero no apareció ninguno con morfología típica de esferoplasto.

No se observó ninguna bacteria en las muestras tomadas de la cepa tratada con amicacina.

En las tinciones realizadas de la cepa tratada con cefotaxima más amicacina solo se observaron en la primera hora bacilos pequeños, gruesos, de extremos romos idénticos al testigo no tratado con antibiótico.

El aspecto morfológico de las bacterias tratadas con gentamicina en la tinción, fué de bacilo con la misma morfología que el testigo no tratado con antibiótico en la primera y segunda hora. En las demás muestras no se observó crecimiento bacteriano.

En las tinciones realizadas la cepa tratada con cefotaxima más gentamicina se observaron bacilos pequeños, gruesos, sólo en la primera y última hora de la curva de muerte.

En la Tabla XI se agrupan estos resultados.

Sensibilidad.

Las concentraciones mínimas inhibitorias de la cepa frente a los antibióticos ensayados en la curva de muerte solos y en combinación (Tabla XII), mantuvieron sus valores iniciales durante todo el tiempo en el que hicimos el experimento.

Turbidez.

Los valores de la turbidez en el medio de cultivo inoculado con esta cepa 32 de P.aeruginosa están expresados en la Tabla XIII.

Se puede observar que sólo el testigo y la cepa tratada con cefotaxima existió un aumento paralelo de la turbidez con el número de unidades formadoras de colonias.

Cuando la cepa fué tratada con sisomicina, amicacina ó con estos antibióticos en combinación, la turbidez a las 24 horas era la misma que teníamos al comienzo del experimento.

Observamos un aumento de dos centésimas cuando la cepa fué tratada con cefotaxima más amicacina y de tres centésimas cuando la cepa fué tratada con gentamicina o cefotaxima más gentamicina.

Valoración del pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de medir el pH en la curva de muerte están expresados en la Tabla XIV.

Podemos observar que sólo el testigo lo incrementó en catorce décimas con respecto al valor inicial. En las demás soluciones el pH disminuyó, oscilando los valores encontrados de una centésima para amicacina a nueve centésimas para la combinación cefotaxima más gentamicina.

Determinación de los niveles de antibióticos por -
cromatografía líquida de alta presión.

Los valores obtenidos en la valoración de las concentraciones de antibióticos medidos por cromatografía líquida de alta presión en el medio de cultivo se recogen en la Tabla XV. Como se puede observar las concentraciones de todos los antibióticos estudiados fueron decreciendo de forma gradual a lo largo de las 24 horas.

Detectamos la existencia de metabolito Desacetil cefotaxima, en la segunda hora, cuando medimos los niveles de cefotaxima sola, mientras que cuando actuó cefotaxima con combinación con aminoglicósidos apareció en la primera hora y fué aumentando en el transcurso del tiempo.

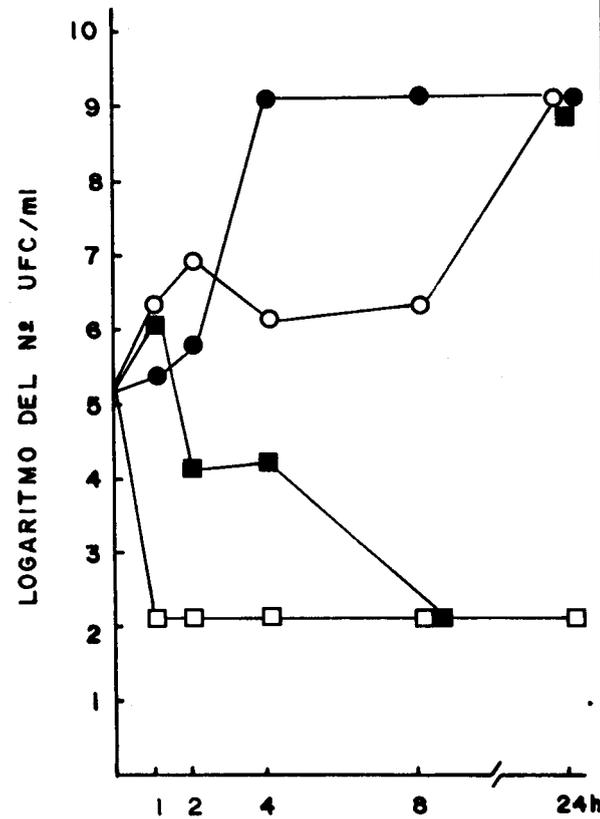
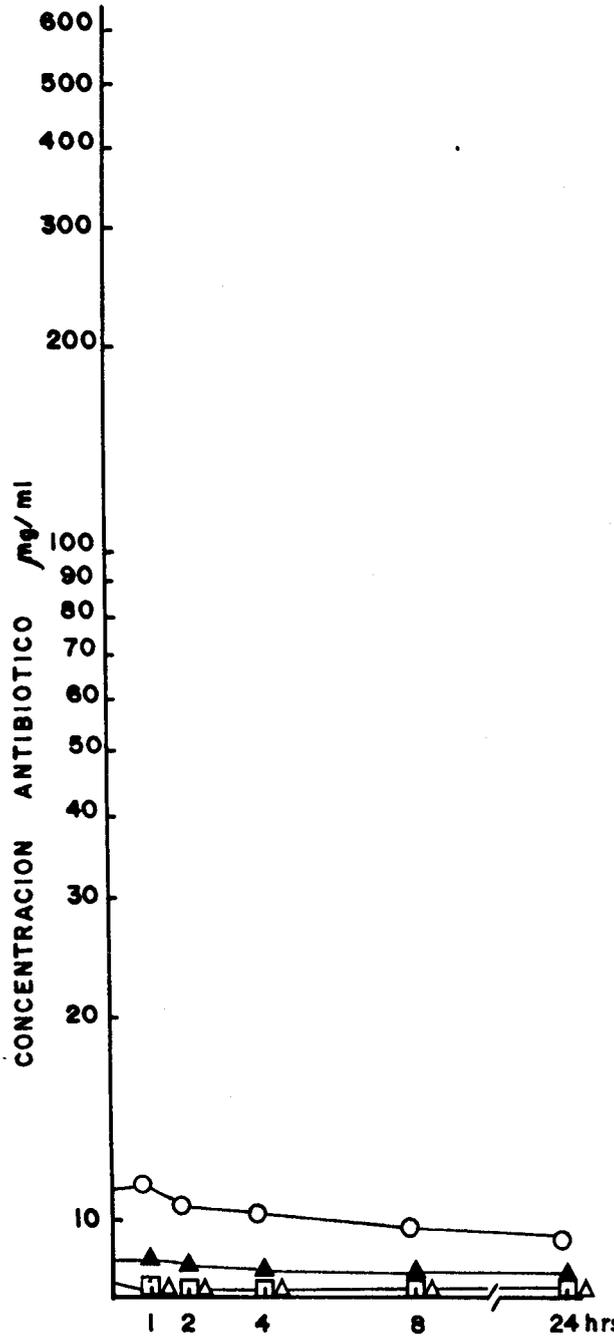
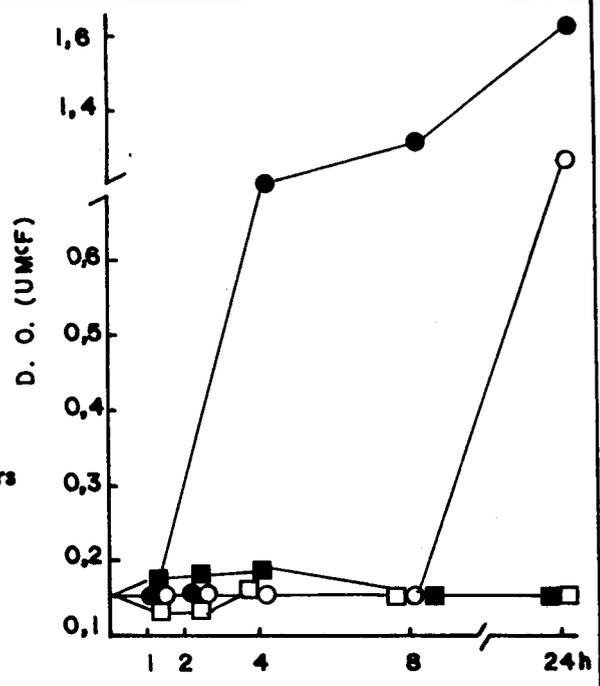
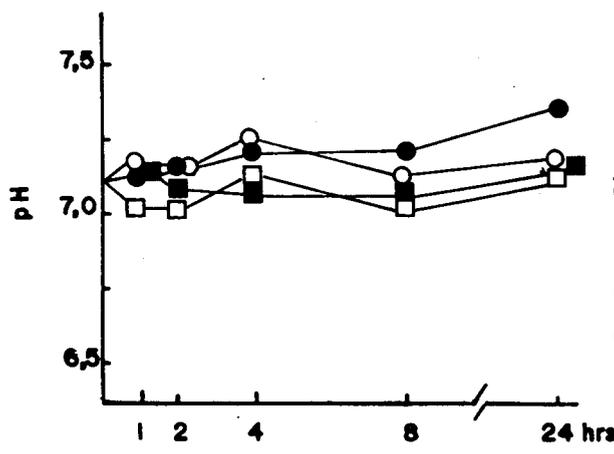
El porcentaje de reducción (Tabla IX) para cefotaxima fué 47,2%. Para los aminoglicósidos, sisomicina fué 58,9%; amicacina tuvo un porcentaje de reducción máximo, 100%; la reducción de gentamicina fué del 94,38%.

En las combinaciones de cefotaxima más aminoglicósidos, los niveles de cefotaxima fueron inferiores a los encontrados cuando se administró solo, lo contrario ocurrió con los aminoglicósidos.

Los porcentajes de reducción de cefotaxima más sisomicina fueron de 44,3% y 25% respectivamente. Los de cefotaxima más amicacina fueron de 30% y 100% respectivamente y los de cefotaxima más gentamicina fueron 36,75% y 74% respectivamente.

TABLA X: RECUENTO DEL NUMERO DE BACTERIAS A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32.

Antibióticos	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Testigo	$5,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	8×10^5	1×10^9	1×10^9	1×10^9
Cefotaxima	$5,2 \times 10^5$	3×10^6	9×10^6	$1,9 \times 10^6$	3×10^6	1×10^9
Sisomicina	$5,2 \times 10^5$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTX+SIS	$5,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	1×10^2	1×10^9
Amicacina	$5,2 \times 10^5$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTX+AMC	$5,2 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
Gentamicina	$5,2 \times 10^5$	1×10^4	$1,2 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTX+GNT	$5,2 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	5×10^3	4×10^3	1×10^2	$1,67 \times 10^5$



- TESTIGO
- 16 µg/ml CTX
- 2 µg/ml SIS
- 4 µg/ml CTX+0,5 µg/ml SIS
- ▲ 4 µg/ml CTX
- △ 0,5 µg/ml SIS

FIGURA 8.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 32, P. aeruginosa

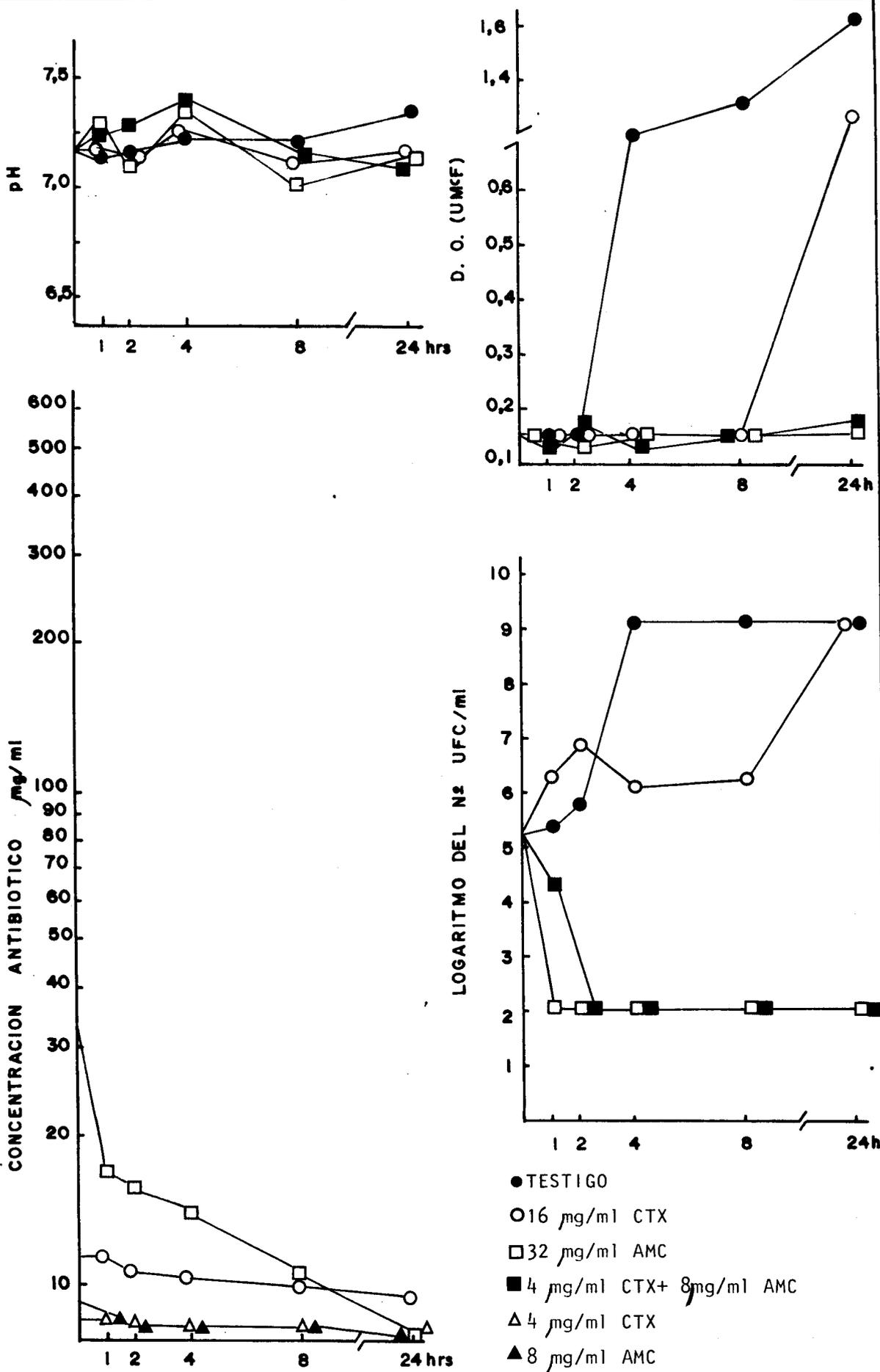
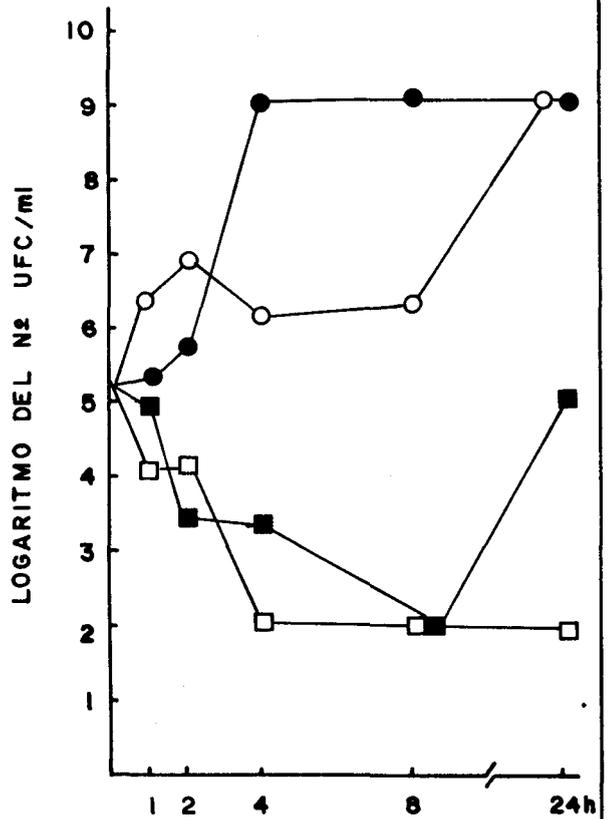
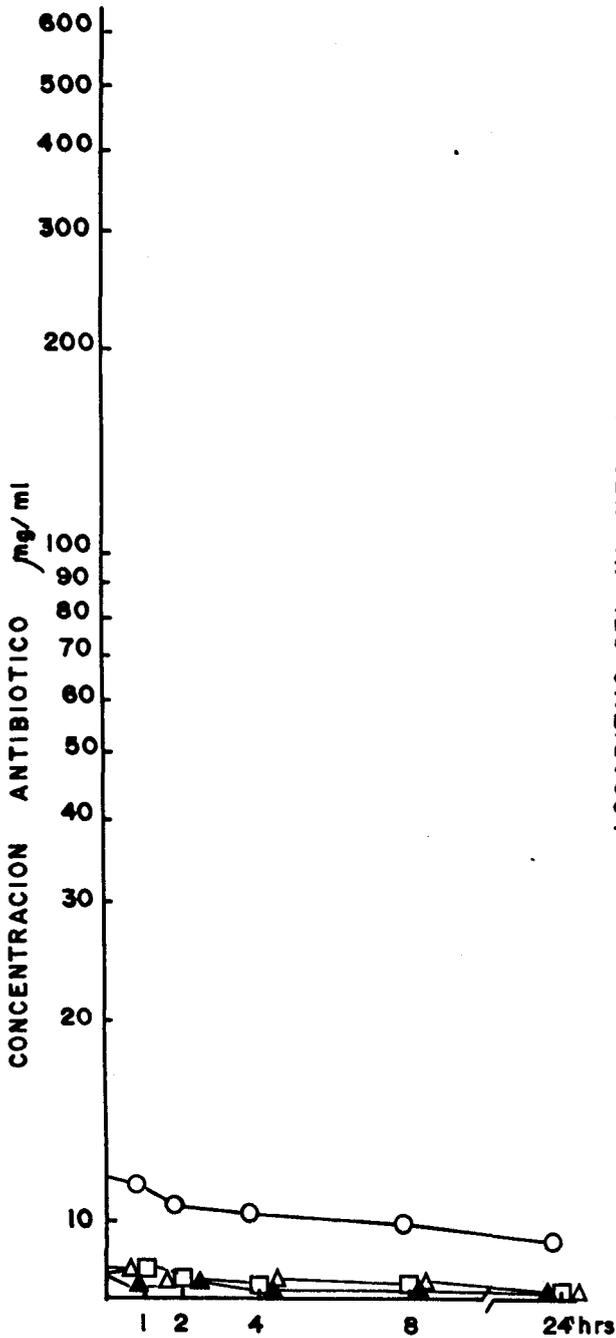
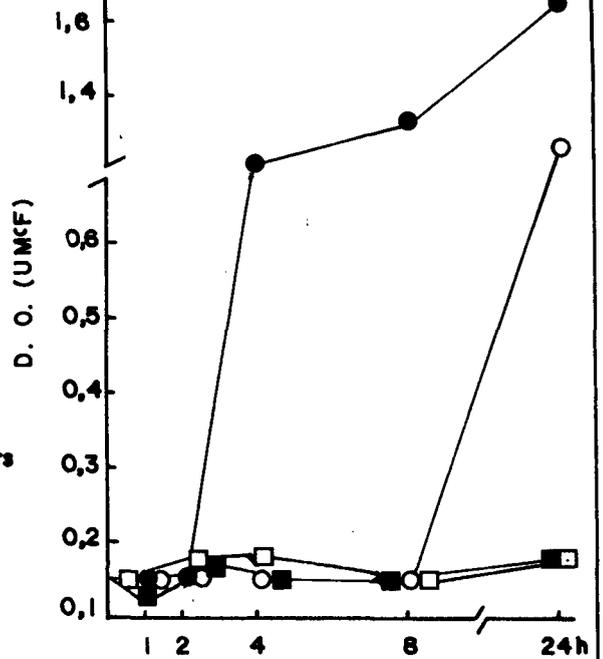
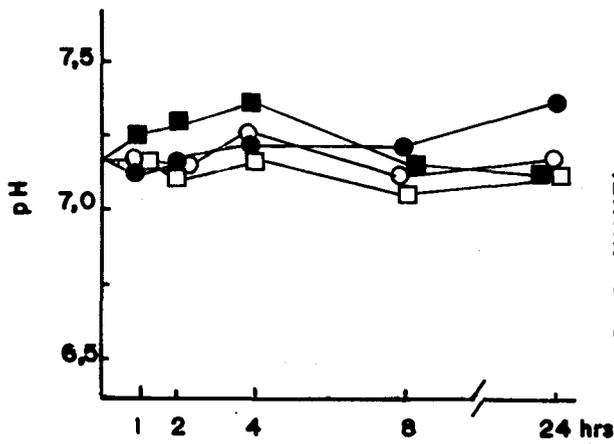


FIGURA 9.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 32 P. aeruginosa



- TESTIGO
- 16 µg/ml CTX
- 8 µg/ml GNT
- 4 µg/ml CTX + 2 µg/ml GNT
- △ 4 µg/ml CTX
- ▲ 2 µg/ml GNT

FIGURA 10.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 32 *P. aeruginosa*

TABLA XI: RESULTADOS DE LA TINCION DE LA CEPA 32.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	BGN	-	NC	NC	-	-	-	-
1	BGN	Esf	-	-	BGN	-	BGN	BGN
2	BGN	Esf	-	-	BGN	BGN	-	-
4	BGN	Esf	-	-	-	BGN	-	-
8	BGN	Esf	-	-	-	BGN	-	-
24	BGN	Esf	-	-	-	BGN	-	-

BGN: Bacilos Gram negativos

Esf: Esferoplastos

(-): No se observan bacterias teñidas.

TABLA XII: VALORES DE CMI ($\mu\text{g/ml}$) A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32.

Antibióticos	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Cefotaxima	32	32	32	32	32	32
Ceftazidima	1	1	1	1	1	1
Sisomicina	4	4	ND	ND	4	4
Amicacina	64	64	ND	ND	ND	ND
Gentamicina	16	16	16	16	16	ND

ND : No detectable por falta de crecimiento.

TABLA XIII: VALORES DE TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32 (en uMCF).

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS							
	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,17
2	0,15	0,15	0,15	0,15	0,18	0,18	0,18	0,18
4	1,15	0,15	0,16	0,15	0,17	0,19	0,15	0,15
8	1,25	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15
24	1,65	1,10	0,15	0,15	0,18	0,15	0,17	0,18

uMCF: Unidad de Mac Farland

TABLA XIV: VALORES DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	7,2	7,2	7,18	7,13	7,2	7,18	7,2	7,19
1	7,12	7,2	7,08	7,30	7,22	7,2	7,26	7,25
2	7,17	7,2	7,08	7,14	7,2	7,15	7,25	7,27
4	7,19	7,25	7,15	7,31	7,2	7,12	7,30	7,30
8	7,19	7,12	7,09	7,05	7,10	7,12	7,25	7,21
24	7,34	7,17	7,12	7,12	7,15	7,15	7,18	7,10

TABLA XV: CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$) EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	CTX	DCTX	SIS	AMC	GNT	CTX	DCTX + SIS	CTX	DCTX + AMC	CTX	DCTX + GNT			
0	11,88	-	1,02	32	8	4	-	0,4	4	-	8	4	-	1,36
1	11,85	-	0,61	17,05	4,02	3,96	0,16	0,26	3,90	0,31	4	3,78	0,28	1,40
2	10,56	0,23	0,59	15,97	3,85	3,46	0,40	0,16	3,26	0,16	2	3,65	0,54	0,83
4	10,10	0,28	0,52	14,12	3,18	3,33	0,99	0,08	3,23	0,08	1,70	3,61	0,50	0,66
8	9,66	0,84	0,48	10,81	2,98	2,76	0,77	0,04	3,02	0,05	1,65	2,93	0,38	0,54
24	8,45	5,37	0,42	-	0,45	2,23	3,93	0,3	2,80	1,67	-	2,53	3,83	0,52

c) Estudio sobre la cepa 85.

Estudiamos las curvas de muerte de la cepa 85 de P.aeruginosa frente a los antibióticos: betalactámico cefotaxima y los aminoglicósidos sisomicina, amicacina y gentamicina, solos y en combinación con el primero.

Los valores de las CMI de los antibióticos ensayados sobre esta cepa y el índice FIC para las combinaciones betalactámicos y aminoglicósidos se exponen a continuación:

Antibióticos	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Antibióticos	Índice FIC
CTX	1	CTX+SIS	8
SIS	2	CTX+AMC	1
AMC	256	CTX+GNT	8
GNT	1		

A partir de los valores de las CMI y FIC señalados anteriormente se deduce que la cepa utilizada era sensible a todos los antibióticos excepto a amicacina.

Las concentraciones de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas para hacer la curva fueron:

CTX	SIS	AMC	GNT	CTX - SIS	CTX - AMC	CTX - GNT
1	2	128	1	1 - 2	0,5 - 128	1 - 1

De los resultados del recuento del número de colonias (Tabla XVI) y su representación gráfica (Figs.11,12,13), podemos destacar que en el testigo aparece una primera fase de latencia seguida de una fase de crecimiento logarítmico, siendo incontables el número de colonias a las 24 horas.

Frente a cefotaxima (Figs.11,12,13) (Tabla XVI), la cepa tuvo un crecimiento progresivo desde el inicio del estudio, observándose un número incontable de colonias a las 24 horas igual al testigo sin antibiótico.

El efecto de sisomicina sobre la cepa 85 (Fig.11) (Tabla XVI) se manifestó por una fase de crecimiento constante hasta la segunda hora, seguido de una fase de crecimiento logarítmico, detectándose un número incontable de colonias a las 24 horas.

La combinación cefotaxima más sisomicina (Tabla XVI) dió lugar a una fase de latencia que abarcó las dos primeras horas, le siguió un aumento progresivo del número de UFC hasta el final de la curva de muerte.

El efecto de la amicacina (Tabla XVI) (Fig.11) nos indica una inhibición del crecimiento bacteriano desde la primera a las 24 horas.

La combinación cefotaxima más amicacina (Fig.-12) (Tabla XVI) sobre esta cepa dió lugar a un incremento del número de UFC en la primera hora, manteniendo desde este momento un crecimiento constante igual que el aminoglicósido sólo.

El comportamiento de la cepa frente a gentamicina (Fig.13) (Tabla XVI) se manifestó por un aumento de diez veces el número de unidades formadoras de colonias en la primera hora continuando en este valor hasta la cuarta hora. Posteriormente recreció la cepa, siendo incontable el número de colonias a las 24 horas.

Por el efecto de la combinación cefotaxima más

gentamicina (Fig.13) (Tabla XIII), la cepa mantuvo un crecimiento constante igual al testigo sin antibiótico hasta la segunda hora. A la cuarta hora aparece inhibición del crecimiento; posteriormente recreció la cepa alcanzando un número incontable de colonias a las 24 horas igual al testigo sin antibiótico.

Morfología de las colonias.

Se observaron colonias grandes convexas, brillantes, de extremos bien delimitados, color verdoso y olor característico a manzana. Esta morfología de las colonias en las placas fué constante durante las 24 horas de estudio frente a todos los antibióticos solos y en combinaciones.

Morfología bacteriana.

El aspecto morfológico de las bacterias del testigo no tratado con antibióticos en la tinción fué de bacilo pequeño de extremos redondeados. Imagen correspondiente a P.aeruginosa que se mantuvo durante las 24 horas de la curva de muerte.

El efecto de cefotaxima sobre esta cepa dió lugar a la aparición de esferoplastos (Fig.6) en todas las tinciones realizadas desde la primera a las 24 horas.

Cuando la cepa fué tratada con sisomicina observamos bacilos de morfología idéntica al testigo no tratado con antibióticos en las primeras 4 horas. En las muestras tomadas más tarde fué de bacilos aumentados de tamaño y grosor.

La combinación cefotaxima más sisomicina dió lu-

gar, en los dos primeras horas, a bacilos con morfología típica de P.aeruginosa, desde la cuarta hora hasta el final aparecieron esferoplastos.

No se observó crecimiento bacteriano cuando la cepa fué tratada con amicacina o cefotaxima más amicacina, nada más que en la primera hora cuando la cepa fué tratada con amicacina sola.

Observamos bacilos pequeños de extremos romos idénticos al testigo no tratado con antibióticos desde la primera a las 24 horas, cuando la cepa fué tratada con gentamicina.

La combinación cefotaxima más gentamicina sobre esta cepa dió lugar a bacilos pequeños y de extremos romos en la primera y segunda hora, posteriormente aparecieron esferoplastos hasta el final del estudio.

En la Tabla XVII se agrupan todos estos resultados.

Sensibilidad.

La CMI de los antibióticos ensayados en la curva de muerte sólo y en combinación, en todas las muestras realizadas, fué igual que la que había inicialmente (Tabla XVIII).

Turbidez.

Los valores obtenidos al medir la turbidez en el medio de cultivo de esta cepa están expresados en la Tabla XIX.

Se puede observar que la turbidez fué aumentando en el tiempo hasta alcanzar un valor superior a la unidad para el testigo y todas las soluciones, las únicas excepciones tuvieron lugar cuando la cepa fué tratada con amicacina, que sólo aumentó en cuatro centésimas y con la combinación cefotaxima más amicacina que conservó la misma turbidez que teníamos al comienzo del experimento.

Valoración del pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de medir el pH del medio de cultivo inoculado con la cepa 85 de P.aeruginosa están expresados en la Tabla XX.

Podemos observar que incrementaron el pH con respecto al valor inicial, el testigo y la cepa tratada con cefotaxima en una seis décimas respectivamente. Para las demás soluciones el pH disminuyó manteniéndose dentro de un rango inferior a la unidad.

Determinación de los niveles de antibióticos por - cromatografía líquida de alta presión.

Los resultados obtenidos en la valoración de las concentraciones de antibióticos medidos por cromatografía líquida de alta presión en el medio de cultivo se recogen en la Tabla XXI. Como se puede observar las concentraciones de todos los antibióticos estudiados fueron decreciendo de forma gradual a lo largo de las 24 horas.

El porcentaje de reducción de las concentraciones iniciales de antibióticos al final de la curva de muerte, (Tabla IX), fué para cefotaxima del 60%. Para los aminoglicósidos la reducción fué del 31,5%, mientras que no se pudo detectar gentamicina.

En las combinaciones de cefotaxima más aminoglicósidos los niveles de cefotaxima fueron inferiores a los encontrados cuando se administró solo, lo contrario ocurrió con los aminoglicósidos.

Los porcentajes de reducción de cefotaxima más sisomicina fueron del 51% y 100% respectivamente. Los de cefotaxima más amicacina fueron del 34% y 35,95% respectivamente, y los de cefotaxima más gentamicina fueron del 28% y no detectables respectivamente.

TABLA XVI: RECUENTO DEL NUMERO DE BACTERIAS A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85.

	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Testigo	$1,6 \times 10^5$	2×10^6	2×10^6	2×10^7	1×10^8	1×10^9
Cefotaxima	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	1×10^7	1×10^8	1×10^9
Sisomicina	$1,6 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	8×10^6	1×10^8	2×10^8	1×10^9
CTX+SIS	$1,6 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	8×10^6	1×10^7	1×10^9
Amicacina	$1,6 \times 10^5$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTX+AMC	$1,6 \times 10^5$	2×10^6	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
Gentamicina	$1,6 \times 10^5$	4×10^6	4×10^6	8×10^6	1×10^8	1×10^9
CTX+GNT	$1,6 \times 10^5$	1×10^5	$2,4 \times 10^5$	1×10^2	$1,2 \times 10^6$	1×10^9

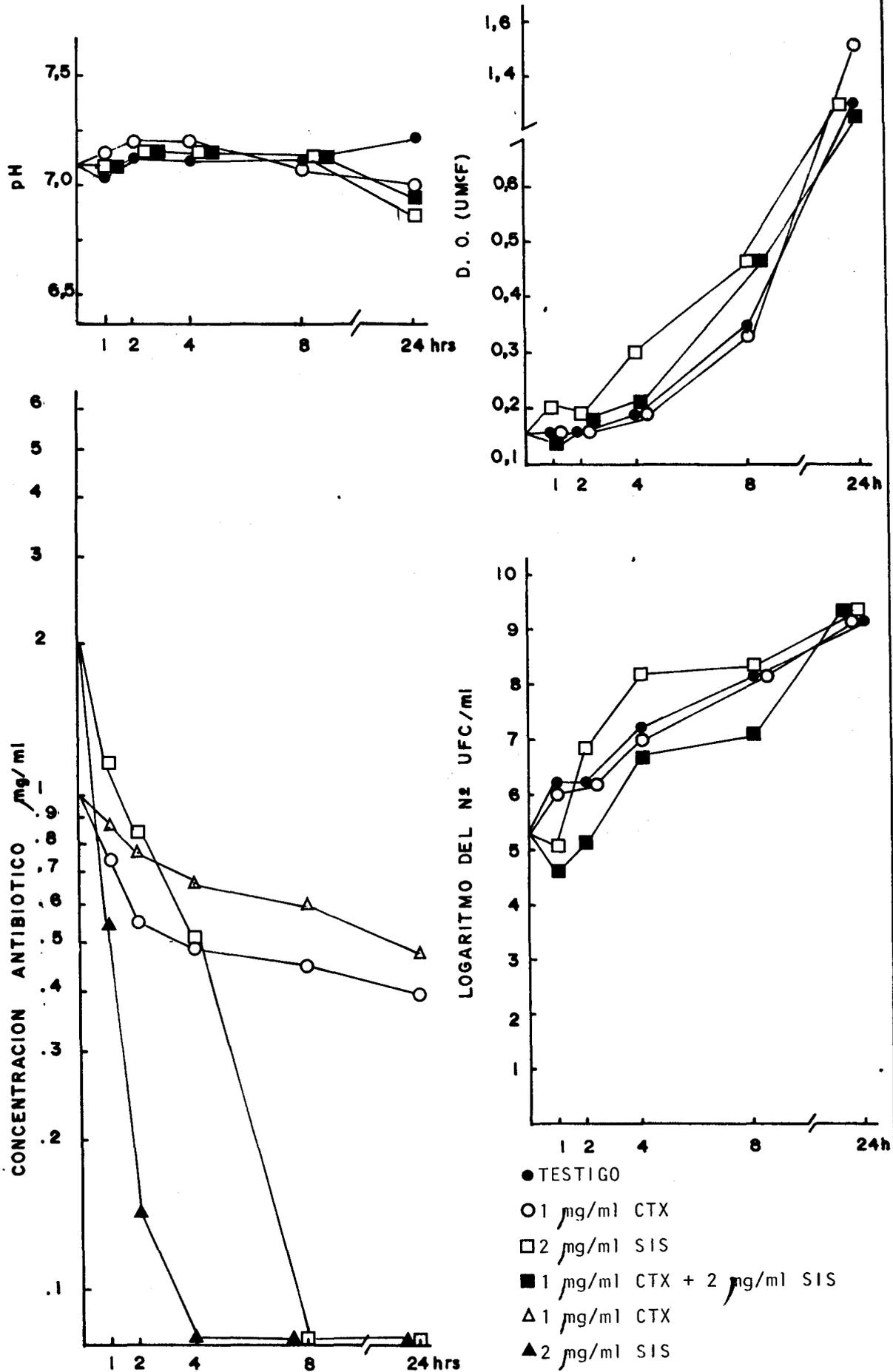


FIGURA 11.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 85 *P. aeruginosa*

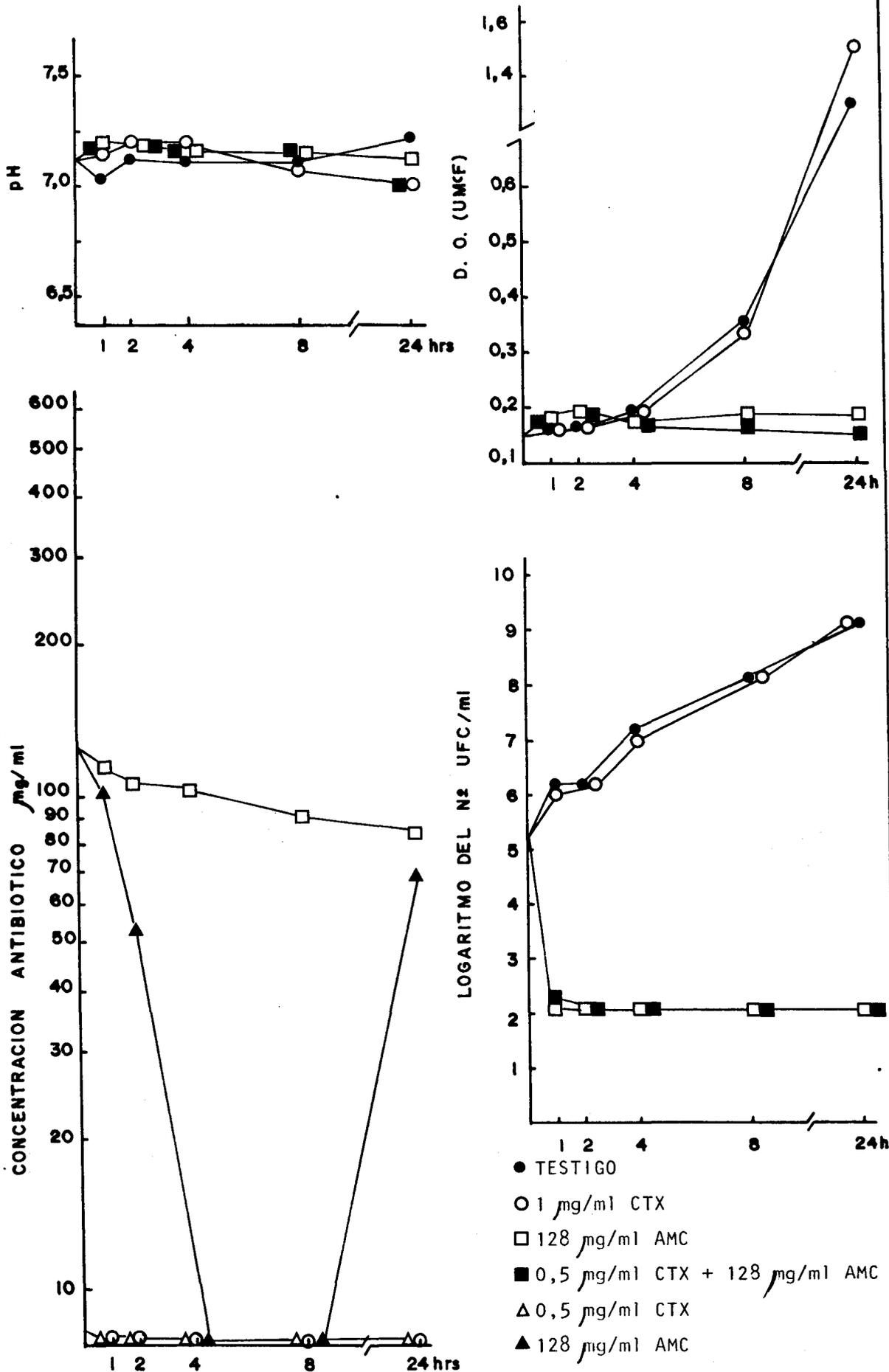


FIGURA 12.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 85 *P. aeruginosa*

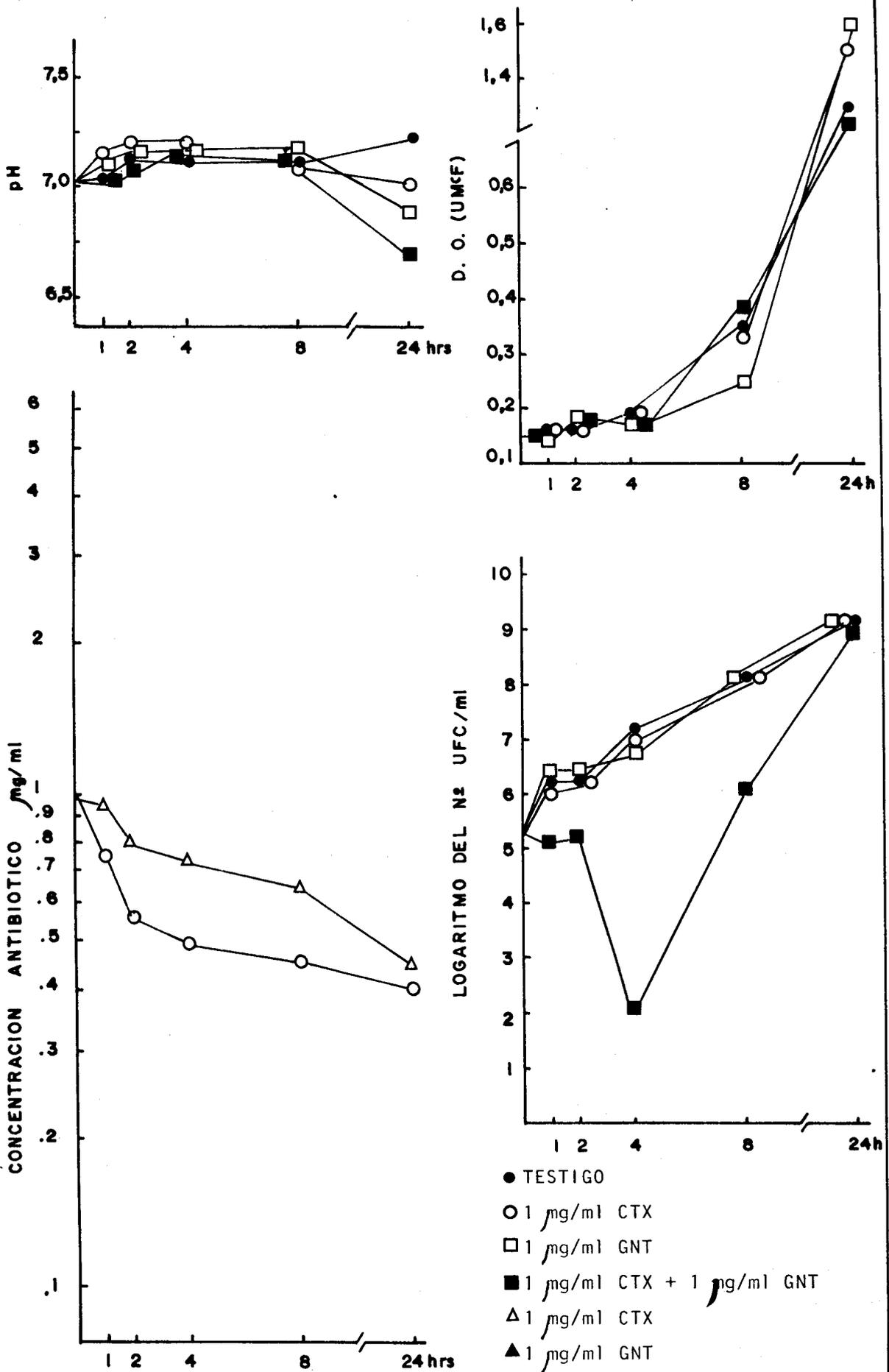


FIGURA 13.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 85 *P. aeruginosa*

TABLA XVII: RESULTADOS DE LA TINCION DE LA CEPA 85.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	BGN	-	-	-	-	-	-	-
1	BGN	Esf	BGN	-	BGN	BGN	-	BGN
2	BGN	Esf	BGN	-	BGN	BGN	-	BGN
4	BGN	Esf	BGN	-	BGN	Esf	-	Esf
8	BGN	Esf	BGN gruesos	-	BGN	Esf	-	Esf
24	BGN	Esf	BGN gruesos	-	BGN	Esf	-	Esf

BGN: Bacilos Gram negativos

Esf: Esferoplastos

(-): No se observan bacterias teñidas.

TABLA XVIII: VALORES DE CMI ($\mu\text{g/ml}$) A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85

Antibióticos	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Cefotaxima	1	1	1	1	1	1
Ceftazidima	1024	1024	1024	1024	1024	1024
Sisomicina	2	2	2	2	2	2
Amicacina	256	ND	ND	ND	ND	ND
Gentamicina	1	1	1	1	1	1

ND: No detectable por falta de crecimiento

TABLA XIX: VALORES DE TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85 (uMCF).

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS							
	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1	0,16	0,16	0,20	0,16	0,15	0,15	0,17	0,15
2	0,16	0,16	0,19	0,19	0,18	0,18	0,16	0,16
4	0,19	0,19	0,30	0,19	0,18	0,20	0,16	0,16
8	0,36	0,35	0,47	0,19	0,25	0,47	0,16	0,39
24	1,25	1,55	1,25	0,19	1,65	1,15	0,15	1,15

uMCF: Unidad de Mac Farland

TABLA XX: VALORES DE pH DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS	CTX+AMC	CTX+GNT
0	7,03	7,03	7,07	7,14	7,07	7,04	7,10	7,04
1	7,06	7,13	7,10	7,18	7,12	7,14	7,20	7,09
2	7,12	7,18	7,16	7,20	7,18	7,15	7,21	7,13
4	7,12	7,18	7,16	7,21	7,18	7,15	7,18	7,13
8	7,12	7,11	7,16	7,15	7,18	7,15	7,18	7,13
24	7,22	7,09	6,87	7,15	6,87	6,92	7,07	6,63

TABLA XXI: CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$) EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85.

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS									
	CTX	SIS	AMC	GNT	CTX+SIS		CTX+AMC		CTX+GNT	
0	1	2	128	ND	1	2	0,45	128	0,98	ND
1	0,74	1,13	115,7	ND	0,86	0,55	0,43	101,69	0,94	ND
2	0,56	0,85	106,8	ND	0,77	0,15	0,39	53,2	0,81	ND
4	0,49	0,50	105,6	ND	0,69	0,06	0,36	-	0,76	ND
8	0,45	0	91,2	ND	0,6	0,05	0,32	-	0,66	ND
24	0,4	0	86,6	ND	0,49	0	0,33	69,7	0,47	ND

ND: No detectable por Cromatografía.

4.2.2.2. Efecto de las combinaciones de ceftazidima.a) Estudio sobre la cepa 25.

Estudiamos las curvas de muerte de la cepa 25 de P.aeruginosa frente a los antibióticos betalactámicos ceftazidima y los aminoglicósidos sisomicina, ampicacina y gentamicina solos y en combinación con aquel.

Los valores de las CMI de los antibióticos ensayados sobre la cepa y el índice FIC para las combinaciones de betalactámicos y aminoglicósidos se exponen a continuación:

<u>Antibióticos</u>	<u>CMI ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>Antibióticos</u>	<u>Indice FIC</u>
CTZ	4	CTZ+SIS	0,53
SIS	10 24	CTZ+AMC	0,56
AMC	1 28	CTZ+GNT	0,56
GNT	10 24		

A partir de los valores de las CMI y FIC señalados anteriormente, se deduce que la cepa utilizada era sensible al betalactámico y resistente a los aminoglicósidos, la interacción de los mismos presentó siempre valores muy sinérgicos, sinergia heteroérgica.

Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas para hacer la curva de muerte fueron:

CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ - SIS	CTZ - AMC	CTZ - GNT
2	512	64	512	0,5 - 128	0,5 - 16	0,5 - 128

De los resultados del recuento del número de colonias (Tabla XXII) y su representación gráfica (Figs.14,15,16) destacamos lo siguiente: El testigo tuvo una primera fase de latencia seguida de una fase de crecimiento logarítmico hasta la octava hora, desde este momento el crecimiento se hizo constante hasta el final.

Frente a ceftazidima (Figs.14,15,16) (Tabla XXII) la cepa mantuvo un crecimiento constante en las dos primeras horas, seguida de una fase en la que disminuyó el número de unidades formadoras de colonias siendo máximo a las ocho horas, posteriormente recreció alcanzando un número incontable de colonias a las 24 horas.

El efecto de la sisomicina sobre la cepa problema pone de manifiesto una disminución del crecimiento bacteriano desde el inicio hasta la cuarta hora, recreciendo de forma progresiva con el tiempo (Tabla XXII y Fig.14).

La combinación ceftazidima más sisomicina (Fig. 14) (Tabla XXII) nos indica una disminución en el número de UFC similar al obtenido con el aminoglicósido solo hasta la octava hora, recreciendo la cepa a partir de este momento y alcanzando a las 24 horas un número de colonias inferior en un logaritmo al que tenía a las cero horas el testigo.

El efecto de la amicacina (Fig.15) (Tabla XXII) fué de disminución en el número de UFC en la primera hora, manteniéndose constante desde este momento hasta que terminó la curva.

La combinación ceftazidima más amicacina (Fig.- 15) (Tabla XXII) sobre la cepa 25 se manifestó por una disminución en el número de UFC semejante al obtenido con el aminoglicósido solo,

manteniendo un crecimiento constante hasta la octava hora, a partir de este momento recreció la cepa alcanzando a las 24 horas un número de colonias inferior en dos logaritmos al que tenía a las cero horas el testigo sin antibiótico.

El comportamiento de la cepa frente a gentamicina (Fig.16) (Tabla XXII) se manifestó por una disminución progresiva del número de UFC desde el inicio hasta el final del estudio, en donde el crecimiento fué constante.

El efecto de la combinación ceftazidima más gentamicina (Fig.16) (Tabla XXII) se manifestó por una disminución del número de UFC en la primera hora, manteniendo un crecimiento constante entre la segunda y octava hora, recreciendo hasta alcanzar un número de colonias de $8,3 \times 10^4$, UFC inferior al que existía a las cero hora.

Morfología de las colonias.

Se observó colonias con aspecto típico de P.aeruginosa grandes, de extremos redondeados, bien delimitados, color verde y olor a fruta. Esta morfología de las colonias en las placas fué constante frente a todos los antibióticos solos y en combinación y en todas las muestras tomadas durante la curva de muerte.

Morfología bacteriana.

La morfología del testigo fué típica de P.aeruginosa, en todas las muestras observadas durante las 24 horas de la curva de muerte.

Cuando la cepa fué tratada con ceftazidima se

observó bacilos largos con algunas zonas engrosadas y aumentadas de coloración, imagen ésta típica de esferoplasto desde la primera, hasta las 24 horas.

En las muestras tomadas cuando esta cepa fué tratada con sisomicina, observamos bacilos pequeños de extremos romos sólo a la 1,8 y 24 horas.

Debido a la interacción de ceftazidima más sisomicina se observaron bacilos iguales al testigo, sólo en la primera y 24 horas del estudio.

Por el efecto de amicacina y su combinación con ceftazidima no observamos crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras tomadas, excepto a las 2 horas cuando la cepa fué tratada con amicacina.

Cuando la cepa fué tratada con gentamicina sólo se observaron bacilos pequeños, de extremos romos en muestras tomadas a la primera, segunda y cuarta hora.

El aspecto morfológico de las cepas tratadas con ceftazidima más gentamicina fué idéntico al del aminoglicósido solo, pero sólo se observó crecimiento en la muestra tomada a la primera y última hora.

Estos resultados sse agrupan en la Tabla XXIII.

Sensibilidad.

La concentración mínima inhibitoria de esa cepa

frente a los antibióticos ensayados en la curva de muerte, solos y en combinación (Tabla V), conservó sus valores originales en todas las muestras tomadas durante las 24 horas del estudio.

Turbidez.

Los valores obtenidos de medir la turbidez en el medio de cultivo inoculado con la cepa 25 de P.aeruginosa más los antibióticos están expresados en la Tabla XXIV.

Se puede observar que sólo con el testigo y con la cepa tratada con ceftazidima existió un aumento de la turbidez, paralelo al número de unidades formadoras de colonia.

Cuando la cepa fué tratada con aminoglicósido la turbidez conservó su valor inicial.

Las combinaciones de ceftazidima más sisomicina y gentamicina aumentaron la turbidez en 3 y 15 centésimas respectivamente, mientras que la combinación ceftazidima más amicacina mantuvo la turbidez igual que a las cero horas.

Valoración del pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de medir el pH en la curva de muerte están expresados en la Tabla XXV. Observamos que el pH inicial fué superior a 7 en todas las soluciones excepto cuando la cepa fué tratada con sisomicina y gentamicina.

El pH del testigo de la cepa tratada con ceftazidima, amicacina y de éstos en combinación, aumentó con respecto

al valor inicial entre 6 y 15 centésimas. En los restantes matraces el pH a las 24 horas fué inferior al inicial, encontrándose dentro de un rango de 2 á 16 centésimas.

Determinación de los niveles de antibióticos por -
cromatografía líquida de alta presión.

Los resultados obtenidos en la valoración de las concentraciones de antibióticos medidos por cromatografía líquida de alta presión en el medio de cultivo inoculado con la cepa 25 de P.aeruginosa se recogen en la Tabla XXVI. Como se puede observar las concentraciones de todos los antibióticos estudiados fueron decreciendo de forma gradual con el tiempo.

El porcentaje de reducción de las concentraciones iniciales de antibióticos a las 24 horas fué de 62,5% para ceftazidima. Cuando los aminoglicósidos actuaron solos, la reducción fué del 67,1% para sisomicina, y para los otros dos aminoglicósidos, amicacina y gentamicina, fué del 100% (Tabla XXVII).

En las combinaciones, los niveles de ceftazidima más sisomicina fueron del 66% y 68,5% respectivamente. Los de ceftazidima más amicacina fueron del 66% y 100% respectivamente, y los de ceftazidima más gentamicina fueron del 50% y 35,9% respectivamente.

TABLA XXII: RECUENTO DEL NUMERO DE BACTERIAS A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25

	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Testigo	$3,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	2×10^8	1×10^9	1×10^9
Ceftazidima	$3,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	3×10^5	8×10^3	1×10^2	1×10^9
Sisomicina	$3,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	6×10^5	1×10^9
CTZ+SIS	$3,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	$3,4 \times 10^4$
Amicacina	$3,2 \times 10^5$	1×10^4	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTZ+AMC	$3,2 \times 10^5$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	2×10^3
Gentamicina	$3,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	1×10^4	$1,3 \times 10^4$	8×10^3	1×10^2
CTZ+GNT	$3,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	$8,3 \times 10^4$

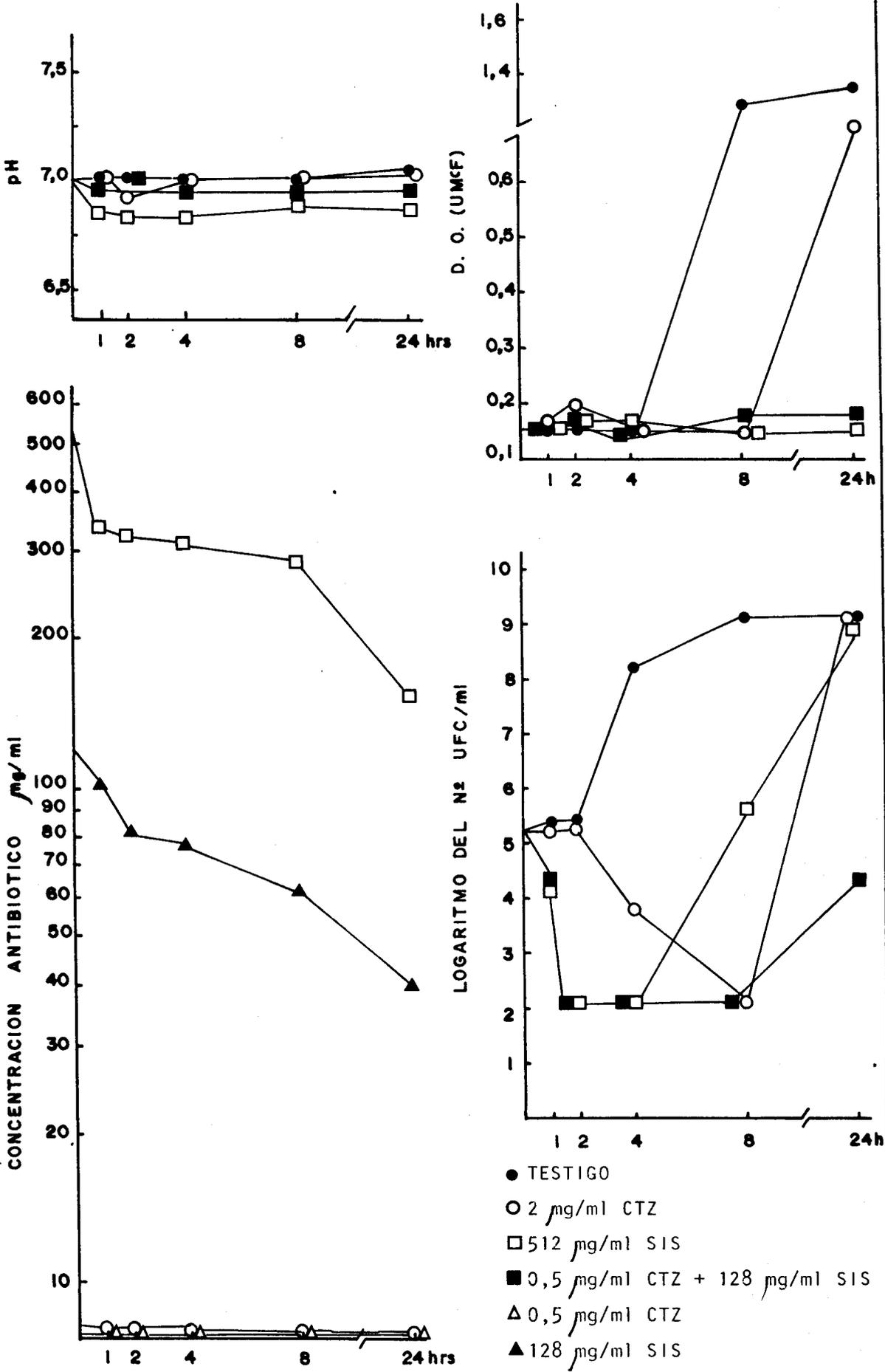


FIGURA 14.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 25, P. aeruginosa

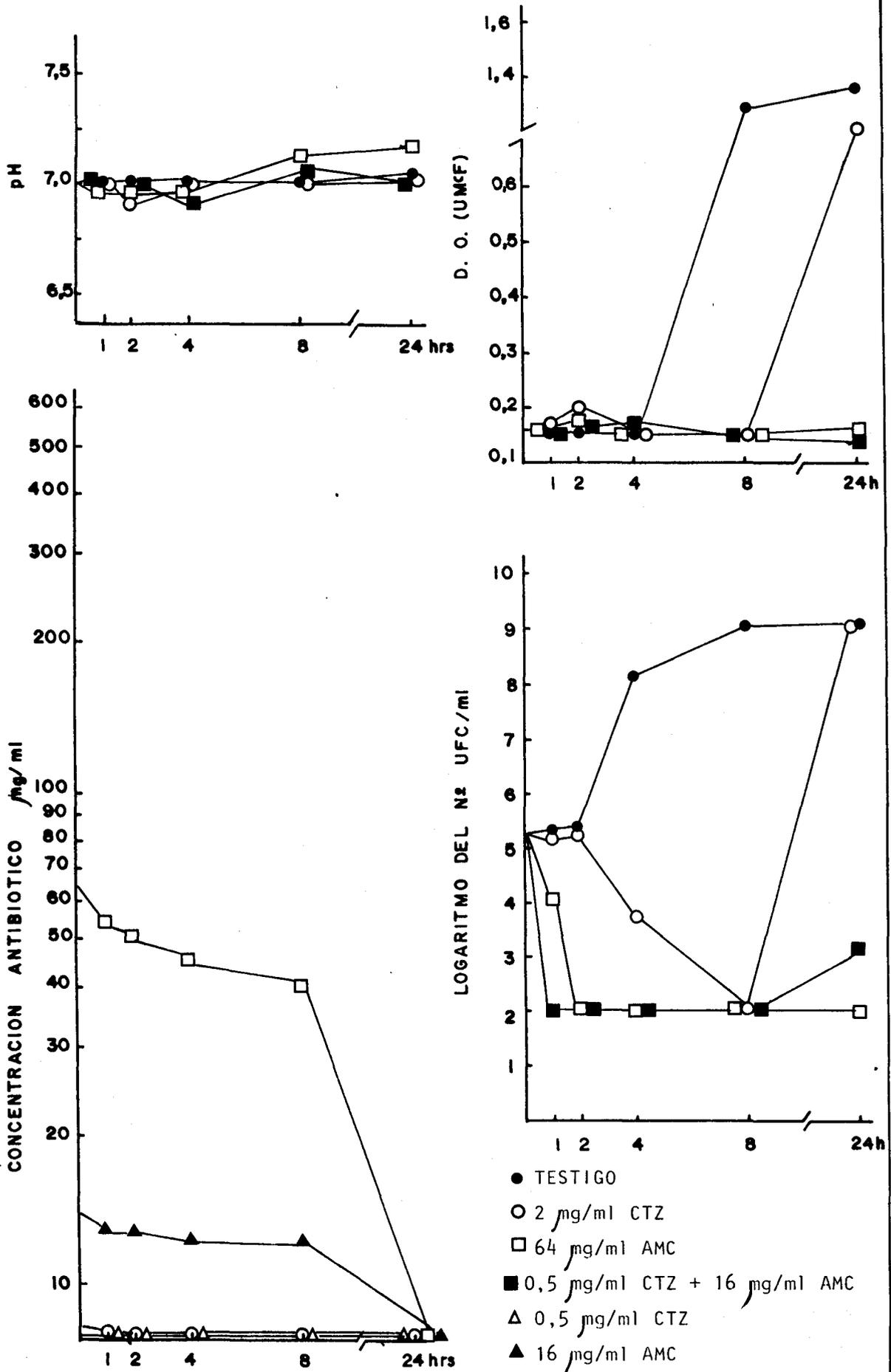


FIGURA 15.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 25, *P. aeruginosa*

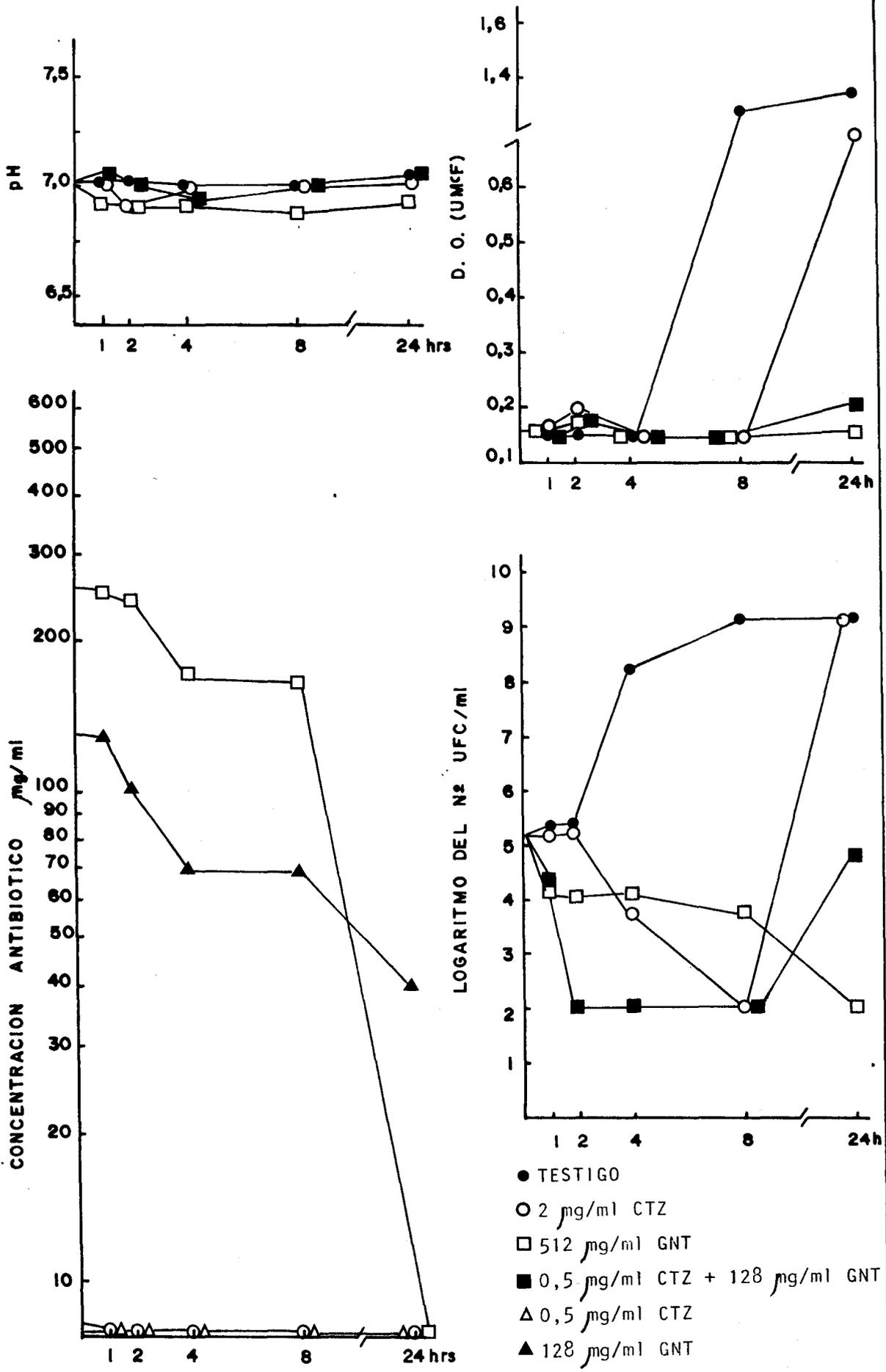


FIGURA 16.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 25, P. aeruginosa

TABLA XXIII: RESULTADOS DE LA TINCIÓN DE LA CEPA 25.

Tiempo (horas)	Testigo	ANTIBIOTICOS						
		CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	BGN	-	-	-	-	-	-	-
1	BGN	Esf	BGN	-	BGN	BGN	-	BGN
2	BGN	Esf	-	-	BGN	-	-	-
4	BGN	-	-	-	BGN	-	-	-
8	BGN	-	BGN	-	-	-	-	-
24	BGN	Esf	BGN	-	-	BGN	-	BGN

BGN: Bacilos Gram negativos

Esf: Esferoplastos

(-): No se observan bacterias teñidas.

TAELA XXIV: VALORES DE TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEP
25 (uM^CF).

ANTIBIOTICOS

Timepo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1	0,15	0,17	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
2	0,15	0,20	0,16	0,16	0,16	0,16	0,18	0,18
4	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
8	1,22	0,15	0,15	0,15	0,15	0,18	0,15	0,15
24	1,25	0,95	0,15	0,16	0,15	0,18	0,15	0,20

uM^CF: Unidad de Mac Farland

TABLA XXV: VALORES DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	7,01	7,01	6,94	7,01	6,97	7,10	7,03	7,10
1	7,03	7,01	6,85	7,08	6,92	7,04	7,04	7,03
2	7,03	6,96	6,84	7,08	6,93	7,05	7,05	7,03
4	7,04	7	6,84	7,06	6,92	6,97	6,97	6,96
8	7,09	7,06	6,87	7,13	6,87	6,97	7,1	7,03
24	7,1	7,07	6,82	7,16	6,94	6,94	7,08	7,08

TABLA XXVI: CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$) EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 25.

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS									
	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS		CTZ+AMC		CTZ+GNT	
0	2	512	64	256	0,5	128	0,49	16	0,5	128
1	2	338,5	54,7	254,2	0,41	100	0,47	13,5	0,5	127
2	2	332,9	50,9	250,8	0,35	80,4	0,43	13,2	0,49	100
4	1,97	307,5	47,9	180,6	0,32	78,3	0,40	12	0,40	70
8	1,82	290,4	40,6	178,1	0,25	62,9	0,31	12,3	0,33	68
24	0,75	168,7	-	-	0,22	40,4	0,22	-	0,25	40

TABLA XXVII: PORCENTAJES DE REDUCCION DE LAS CONCENTRACIONES INICIALES DE ANTIBIOTICOS A LAS 24 HORAS EN LAS TRES CEPAS.

ANTIBIOTICOS	Nº DE CEPAS		
	25	32	85
CTZ	62,5	52	45,2
SIS	67,1	63	20
AMC	100	100	31,5
GNT	100	70,25	ND
CTZ+SIS	66-68,5	66-93,5	51,2-65
CTZ+AMC	66-100	58,6-100	55,6-35,5
CTZ+GNT	50-35,9	60-68,75	58,9-ND

b) Estudio sobre la cepa 32.

Estudiamos las curvas de muerte de la cepa 32 de P.aeruginosa frente a los antibióticos betalactámicos ceftazidima y los aminoglicósidos sisomicina, amicacina y gentamicina, solos y en combinación con aquel.

Los valores de las CMI de los antibióticos ensayados sobre la cepa y el índice FIC para las combinaciones betalactámicos y aminoglicósidos se exponen a continuación:

<u>Antibióticos</u>	<u>CMI ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>Antibióticos</u>	<u>Indice FIC</u>
CTZ	1	CTZ+SIS	1
SIS	4	CTZ+AMC	0,012
AMC	64	CTZ+GNT	1
GNT	16		

A partir de los valores de la CMI y FIC, señalados anteriormente, se deduce que la cepa era sensible a ceftazidima y sisomicina, resistente a los otros dos antibióticos. La interacción de los mismos presentó valores indiferentes y sinérgicos.

Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas para hacer la curva de muerte fueron:

CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ - SIS	CTZ - AMC	CTZ - GNT
0,5	2	32	8	0,5 - 2	0,12 - 8	0,5 - 8

De los resultados del recuento del número de colonias (Tabla XXVIII) y su representación gráfica (Figs.17,18,19) destacamos: El testigo tuvo una fase de latencia en la que el crecimiento fué constante hasta la segunda hora, después se hizo logarítmico y a partir de la octava hora fué constante hasta el final del estudio.

Frente a ceftazidima (Figs.17,18,19) (Tabla XXVIII) la cepa mantuvo un crecimiento constante pero siempre inferior al testigo sin antibiótico en las primeras 8 horas, igualándose al mismo a las 24 horas.

El efecto de la sisomicina (Fig.17) (Tabla XXVIII) sobre la cepa 32 fué de inhibición del crecimiento bacteriano desde la primera a la octava hora, recreciendo la cepa a partir de este momento, alcanzando un número incontable de colonias a las 24 horas igual al testigo sin antibiótico.

El efecto de la combinación ceftazidima más sisomicina (Fig.17) (Tabla XXVIII) dió lugar a una disminución en el número de UFC similar al obtenido con el aminoglicósido sólo, el número de colonias a las 24 horas fué inferior en 4 logaritmos al testigo sin antibiótico.

El efecto de la amicacina (Fig.18) (Tabla XXVIII) nos indica que el crecimiento bacteriano fué inhibido desde el inicio hasta el final de la curva.

La combinación ceftazidima más amicacina (Fig.18) (Tabla XXVIII) sobre esta cepa se manifestó por una disminución del número de unidades formadoras de colonias idéntico al obtenido con el aminoglicósido solo hasta la octava hora, recreciendo la cepa a partir de este momento y apareciendo un número de colonias igual al que había a las cero horas.

Cuando la cepa fué tratada con gentamicina (Fig. 19) (Tabla XXVIII) tuvo lugar una inhibición del crecimiento bacteriano de la primera a la octava hora, recreciendo la cepa desde este momento

y alcanzando un número incontable de colonias a las 24 horas, igual al testigo sin antibiótico.

El efecto de la combinación ceftazidima más gentamicina (Fig.19) (Tabla XXVIII) nos indica una inhibición del crecimiento bacteriano de la primera a la octava hora, recreciendo la cepa a partir de este momento y apareciendo un número de colonias igual al testigo sin antibiótico a las cero horas.

Morfología de las colonias.

Se observaron colonias grandes, de extremos redondeados, color verdoso y olor característico a manzana. Esta morfología de las colonias en las placas fué constante durante las 24 horas del estudio frente a todos los antibióticos solos y en combinación.

Morfología bacteriana.

El aspecto morfológico de las bacterias del testigo sin antibiótico, con la tinción con azul de metileno y observado al microscopio óptico, con objetivo de 100x, fué de bacilo pequeño, de extremos redondeados, imagen típica de P.aeruginosa, que se mantuvo durante las 24 horas de la curva de muerte.

El efecto de ceftazidima sobre esta cepa 32 dió lugar a esferoplastos desde la primera a la última hora del experimento.

Cuando la cepa fué tratada con sisomicina o ceftazidima más sisomicina sólo se observaron bacilos con morfología típica de P.aeruginosa a las 24 horas.

No se observó ninguna bacteria en las muestras tomadas cuando la cepa fué tratada con amicacina.

Con la combinación ceftazidima más amicacina se observaron bacilos pequeños y extremos redondeados, sólo en la muestra tomada a las 24 horas.

El aspecto morfológico de las bacterias tratadas con gentamicina o ceftazidima más gentamicina en la tinción fué de bacilo igual al testigo no tratado con antibiótico, sólo a las 24 horas en el resto de las tinciones no se observó crecimiento.

Estos resultados se agrupan en la Tabla XXIX.

Sensibilidad.

La concentración mínima inhibitoria de los antibióticos ensayados solos y en combinación en la curva de muerte (Tabla XII) se mantuvo constante en el intervalo de tiempo que abarcó este estudio.

Turbidez.

Los valores de la turbidez en el medio de cultivo inoculado con esta cepa 32 de P.aeruginosa con antibióticos están expresados en la Tabla XXX.

Se puede observar que sólo el testigo y la cepa tratada con ceftazidima y sisomicina aumentaron su turbidez con el tiempo. En las demás soluciones el incremento de ésta fué muy escaso oscilando de 1 a 5 centésimas.

Valoración del pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de medir el pH en la curva de muerte están recogidos en la Tabla XXXI. Podemos afirmar que éste se mantuvo en sus valores originales. Sólo aumentaron el pH el testigo y la cepa tratada con amicacina, gentamicina y ceftazidima más gentamicina, oscilando este incremento entre 3 y 20 centésimas.

En las demás soluciones el pH alcanzado a las 24 horas fué ligeramente inferior al que teníamos al iniciar el estudio.

Determinación de los niveles de antibióticos por - cromatografía líquida de alta presión.

Los resultados obtenidos en la valoración de las concentraciones de antibióticos medidos por cromatografía líquida de alta presión en el medio de cultivo se recogen en la Tabla XXXII.

Como se puede observar las concentraciones de todos los antibióticos estudiados fueron decreciendo de forma gradual a lo largo de las 24 horas.

Observamos que los porcentajes de reducción de las concentraciones iniciales de antibiótico a las 24 horas fueron siempre superior al 50% (Tabla XXVII).

La reducción de los niveles de ceftazidima tanto cuando actuó solo como cuando lo hizo en combinación fueron los más bajos (52%).

Amicacina tuvo el porcentaje de reducción mayor (100%) y el mínimo de entre los aminoglicósidos fué sisomicina (63%), pa-

ra gentamicina fué del 70,25%.

Los porcentajes de reducción de ceftazidima más sisomicina fueron del 66% y 93,5% respectivamente. Los de ceftazidima más amicacina fueron del 58% y 100% respectivamente y los de ceftazidima más gentamicina fueron del 60% y 68,75% respectivamente.

TABLA XXVIII: RECUESTO DEL NUMERO DE BACTERIAS EN LA CURVA DE LA CEPA 32 P.AERUGINOSA.

	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Testigo	1×10^5	$2,04 \times 10^5$	$2,12 \times 10^5$	1×10^8	1×10^9	1×10^9
Ceftazidima	1×10^5	$3,28 \times 10^5$	5×10^5	8×10^4	1×10^5	1×10^9
Sisomicina	1×10^5	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^9
CTZ+SIS	1×10^5	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	$3,27 \times 10^5$
Amicacina	1×10^5	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTZ+AMC	1×10^5	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	$5,36 \times 10^5$
Gentamicina	1×10^5	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^9
CTZ+GNT	1×10^5	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	$1,37 \times 10^5$

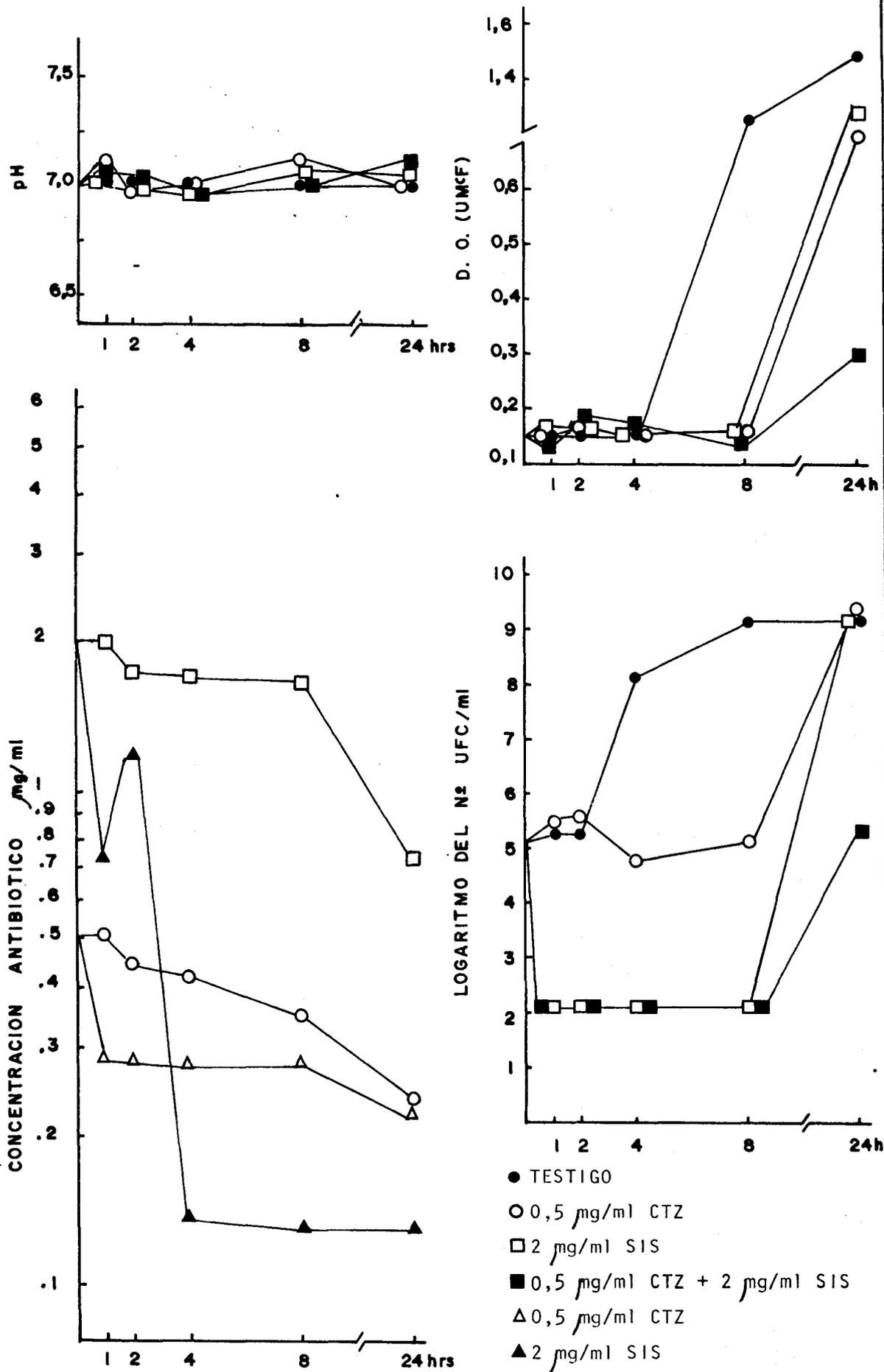


FIGURA 17.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 32, *P. aeruginosa*

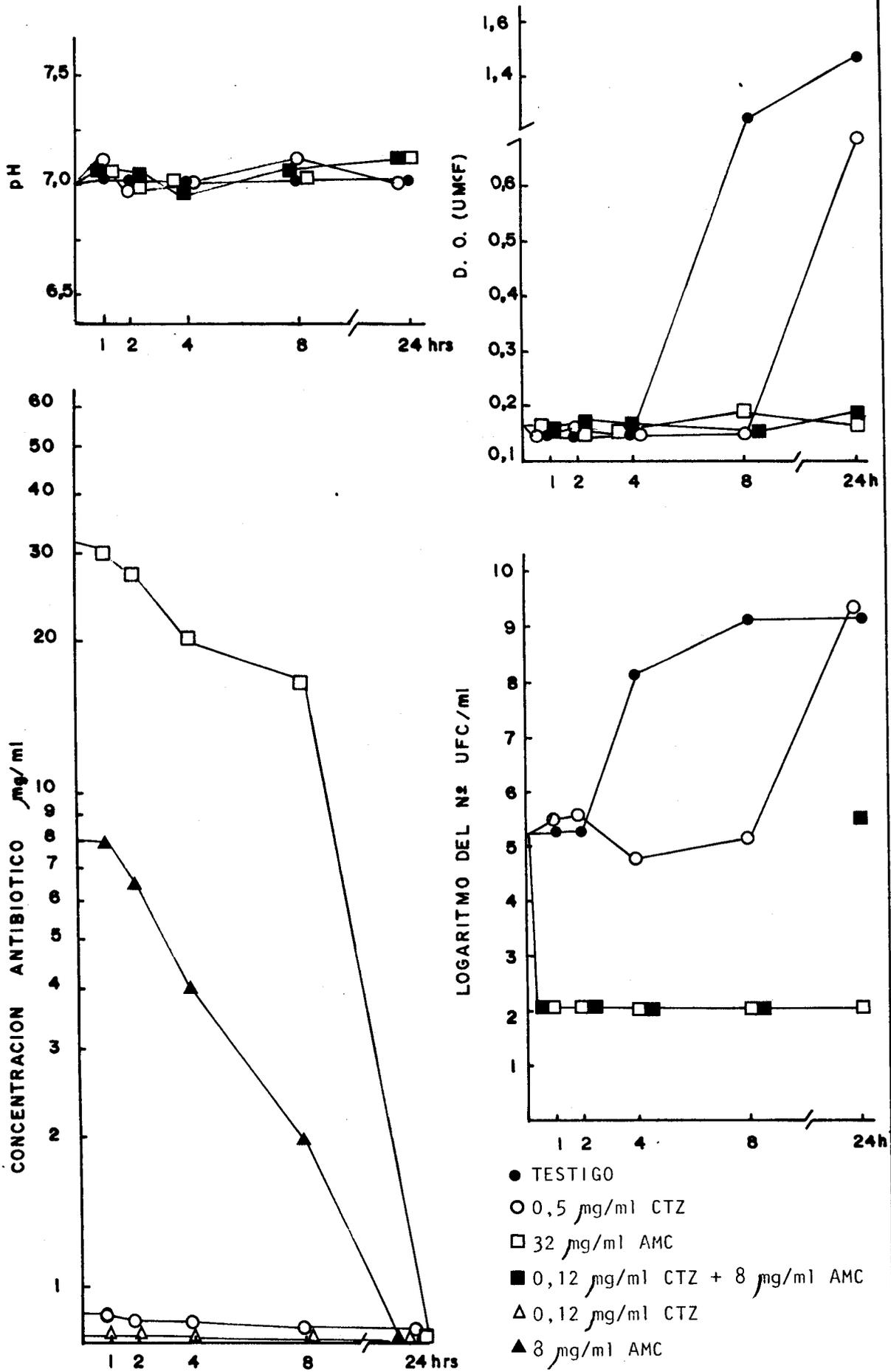


FIGURA 18.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 32, *P. aeruginosa*

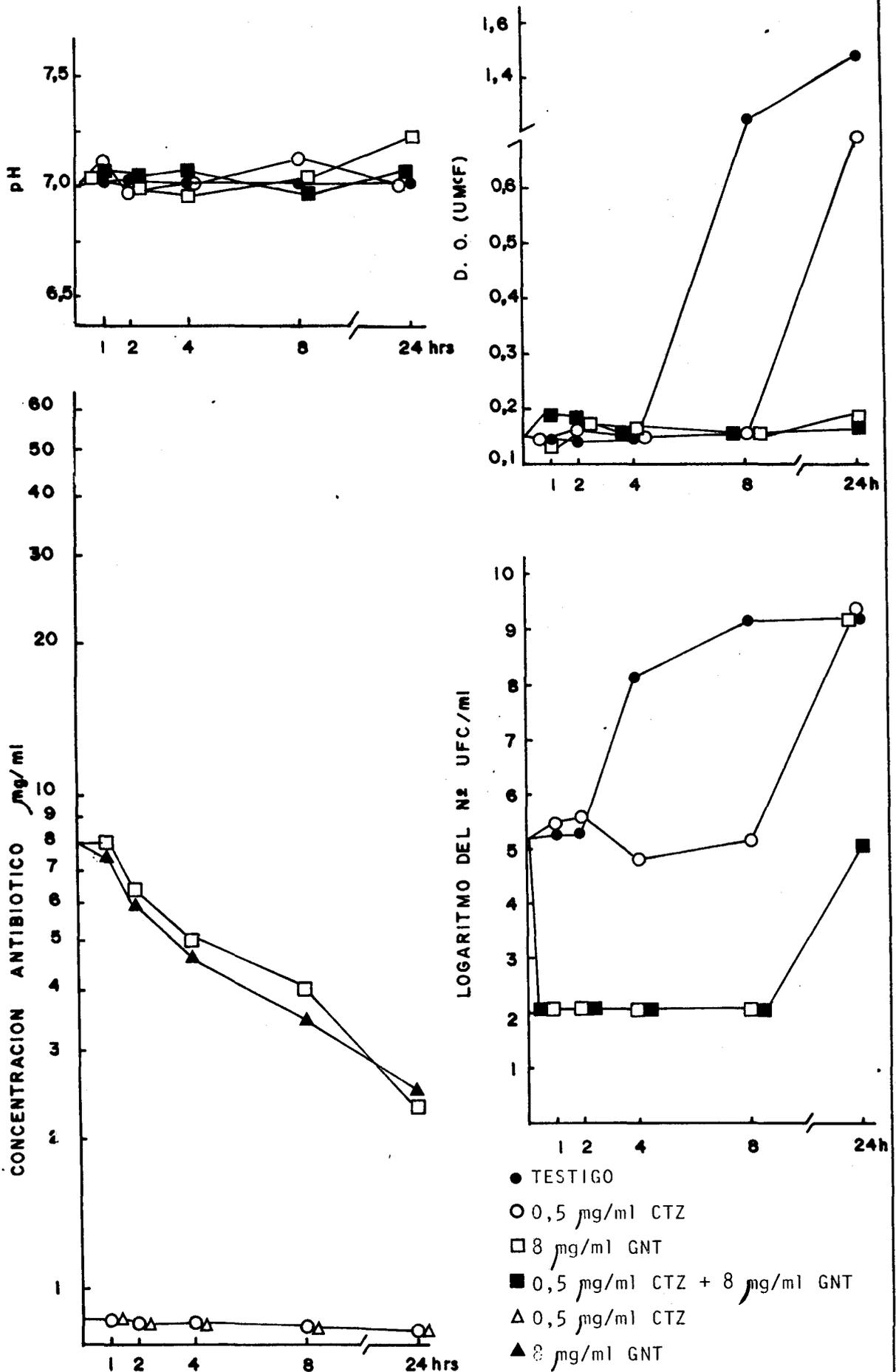


FIGURA 19.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 32, *P. aeruginosa*

TABLA XXIX: RESULTADOS DE LA TINCION DE LA CEPA 32.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	BGN	-	-	-	-	-	-	-
1	BGN	Esf	-	-	-	-	-	-
2	BGN	Esf	-	-	-	-	-	-
4	BGN	Esf	-	-	-	-	-	-
8	BGN	Esf	-	-	-	-	-	-
24	BGN	Esf	BGN	-	BGN	BGN	BGN	BGN

BGN: Bacilos Gram negativos

Esf: Esferoplastos

(-): No se observan bacterias teñidas

TABLA XXX: VALORES DE TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32 (uMCF).

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,19
2	0,15	0,16	0,17	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17
4	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
8	1,29	0,16	0,15	0,19	0,15	0,15	0,15	0,15
24	1,45	0,75	0,95	0,16	0,18	0,30	0,18	0,18

uMCF: Unidad de Mac Farland

TABLA XXXI: VALORES DEL pH DEL MEDIO DEL CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	7,03	7,05	7,09	7,03	7,03	7,06	7,06	7,03
1	7,06	7,10	7,02	7,06	7,04	7,07	7,07	7,07
2	7,02	6,94	6,99	6,96	7,02	7,03	7,03	7,07
4	7,02	7,05	6,99	7,01	6,99	6,98	6,98	7,02
8	7,02	7,11	7,11	7,05	7,08	6,97	7,04	6,99
24	7,06	7,05	7,03	7,12	7,23	7,02	7,12	7,06

TABLA XXXII: CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$) EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 32.

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS									
	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS		CTZ+AMC		CTZ+GNT	
0	0,5	2	32	8	0,5	2	0,12	8	0,5	8
1	0,5	2	30	8	0,29	0,74	0,12	7,9	0,5	7,8
2	0,43	1,79	27,5	6,29	0,26	1,19	0,10	6,5	0,43	6
4	0,41	1,78	20	5,09	0,26	0,14	0,10	4	0,30	4,83
8	0,36	1,74	17,9	4,02	0,26	0,13	0,07	2	0,21	3,33
24	0,24	0,74		2,38	0,22	0,13	0,05	-	0,20	2,5

c) Estudio sobre la cepa 85.

Estudiamos las curvas de muerte de la cepa 85 de P.aeruginosa frente a los antibióticos betalactámicos ceftazidima y los aminoglicósidos sisomicina, ampicacina y gentamicina, solos y en combinación con aquel.

Los valores de las CMI de los antibióticos ensayados sobre la cepa y el índice FIC para las combinaciones de betalactámicos y aminoglicósidos se exponen a continuación:

<u>Antibióticos</u>	<u>CMI ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>Antibióticos</u>	<u>Indice FIC</u>
CTZ	1025	CTZ+SIS	4
SIS	2	CTZ+AMC	0,25
AMC	256	CTZ+GNT	0,25
GNT	1		

A partir de los valores de la CMI y FIC señalados anteriormente se deduce que esta cepa era sensible a sisomicina y gentamicina y resistente a ceftazidima y ampicacina, la interacción de los mismos fué antagónica para la combinación ceftazidima más sisomicina y sinérgica para las otras dos.

Las concentraciones de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas en la curva fueron:

CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ - SIS	CTZ - AMC	CTZ - GNT
1025	2	128	0,5	1025 - 2	128 - 32	128 - 0,12

De los resultados del recuento del número de colonias (Tabla XXXIII) y su representación gráfica (Figs.20,21,22) destacamos lo siguiente: El testigo mantuvo un crecimiento constante hasta la

segunda hora, le sigue una fase de crecimiento logarítmico, haciéndose después constante hasta el final.

Frente a ceftazidima (Tabla XXXIII) (Figs.20,21, 22) la cepa tuvo un crecimiento constante en las dos primeras horas, le sigue una fase de crecimiento logarítmico, siendo incontable el número de colonias desde la cuarta hora hasta el final del estudio.

El efecto de la sisomicina (Tabla XXXIII) (Fig.- 20) sobre la cepa problema pone de manifiesto una fase de latencia que se extendió hasta la segunda hora, después el crecimiento se hizo logarítmico detectándose un número incontable de colonias a las 24 horas.

La combinación ceftazidima más sisomicina (Tabla XXXIII) sobre esta cepa 85, dió lugar a una fase de latencia que abarcó las dos primera horas, después el crecimiento fué máximo, le sigue una disminución progresiva del mismo, existiendo una inhibición del crecimiento a las 24 horas.

El efecto de la amicacina (Fig.21) (Tabla XXXIII) nos indica una inhibición del crecimiento bacteriano desde la primera hora hasta el final de la curva de muerte.

La combinación ceftazidima más amicacina (Fig.- 21) (Tabla XXXIII) sobre la cepa 85 se manifestó por una disminución del número de UFC en la primera hora, seguido de un crecimiento escaso y mantenido con posterior inhibición del crecimiento bacteriano, desde la octava hora hasta el final.

Frente a gentamicina (Tabla XXXIII) (Fig.22) la

cepa tuvo una fase de latencia hasta la cuarta hora, seguido de una fase de crecimiento logarítmico alcanzando un número de unidades formadoras de colonias igual al testigo sin antibiótico desde la octava hora hasta el final de la curva de muerte.

La combinación ceftazidima más gentamicina (Fig. 22) (Tabla XXXIII) se manifestó por una disminución progresiva del número de unidades formadoras de colonias similar al obtenido con el aminoglicósido solo, que fué máximo a la octava hora, recreciendo lentamente desde este momento alcanzando a las 24 horas un número de colonias igual al que teníamos a las cero horas.

Morfología de las colonias.

Se observaron colonias grandes, convexas, brillantes, de extremos bien delimitados, color verdoso y olor característico a manzana. Este aspecto de las colonias en las placas fué constante durante las 24 horas del estudio frente a todos los antibióticos solos y en combinación.

Morfología bacteriana.

El aspecto morfológico de las bacterias del testigo en las tinciones fué de bacilo pequeño, de extremos redondeados, esta imagen es típica de P.aeruginosa y se mantuvo durante las 24 horas de la curva de muerte.

El efecto de ceftazidima sobre la cepa 85 dió lugar a la aparición de esferoplastos, como pudimos observar en todas las tinciones realizadas desde la primera a las 24 horas.

Cuando la cepa fué tratada con sisomicina obser-

vamos bacilos de morfología idéntica al testigo no tratado con antibióticos en las cuatro primeras horas, en las muestras tomadas posteriormente el aspecto morfológico fué de bacilo de mayor grosor y más alargado que el testigo.

El aspecto morfológico de la bacteria tratada con ceftazidima más sisomicina en la primera y segunda hora, fué de P.aeruginosa; después aparecieron esferoplastos en las muestras tomadas a las 4 y 8 horas. No se observó crecimiento en la muestra tomada a última hora.

No se observó ningún crecimiento bacteriano cuando la cepa fué tratada con amicacina.

Cuando la cepa 85 fué tratada con ceftazidima más amicacina, se observaron bacilos con morfología típica de P.aeruginosa, sólo a las 2 y 4 horas del estudio.

En las tinciones realizadas de la cepa tratada con gentamicina se observaron bacilos idénticos al testigo sin tratar con antibióticos en la primera, segunda y cuarta horas y en las dos últimas muestras éstos aumentaron de grosor y se alargaron.

La combinación ceftazidima más gentamicina sobre esta cepa 85 dió lugar a bacilos pequeños de extremos romos en las primera y segunda horas. A las 4 horas no se detectó crecimiento, reapareciendo a las 8 horas y hasta el final de la curva de muerte como esferoplastos.

Estos resultados se agrupan en la Tabla XXXIV.

Turbidez.

Los valores de la turbidez en el medio de cultivo inoculado con esta cepa 85 de P.aeruginosa están expresados en la Tabla XXXV.

Se puede observar que fué incrementándose con el tiempo, tanto el testigo como la cepa tratada con ceftazidima, sisomicina y gentamicina. En las demás preparaciones el aumento fué muy escaso, osciló entre 5 centésimas para amicacina y 12 centésimas para ceftazidima más aminoglicósidos.

Valoración del pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de medir el pH en la curva de muerte están expresados en la Tabla XXXVI. Podemos afirmar que éste se mantuvo en sus valores originales. Sólo incrementaron sus valores con respecto al pH inicial el testigo y la cepa tratada con sisomicina y ceftazidima más sisomicina; estos aumentos fueron de 3 y 4 centésimas.

Cuando la cepa fué tratada con ceftazidima no modificó su pH inicial. En el resto de las soluciones disminuyó también entre 2 y 4 centésimas.

Determinación de los niveles de antibióticos por - cromatografía líquida de alta presión.

Los resultados obtenidos al medir las concentraciones de antibióticos por cromatografía líquida de alta presión en el medio de cultivo se recogen en la Tabla XXXVII.

Como se puede observar las concentraciones de todos los antibióticos estudiados fueron decreciendo de forma gradual a lo largo de las 24 horas.

El porcentaje de reducción para ceftazidima fué 45,2% para sisomicina fué 20%, amicacina 31,5%, no siendo posible detectar niveles de gentamicina (Tabla XXVII).

En las combinaciones de ceftazidima más aminoglicósidos, las concentraciones de ceftazidima fueron siempre superior al 50%.

Los porcentajes de reducción de ceftazidima más sisomicina fueron del 51,2% y de 65% respectivamente.

Los de ceftazidima más amicacina fueron de 55,6% y 35,5% respectivamente, y los de ceftazidima más gentamicina fueron 58,9% para el primero, no siendo posible detectar gentamicina desde el inicio.

TABLA XXXIII: RECUENTO DEL NUMERO DE BACTERIAS A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85.

	TIEMPO (horas)					
	0	1	2	4	8	24
Testigo	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	1×10^9	1×10^9	1×10^9
Ceftazidima	$1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	1×10^9	1×10^9	1×10^9
Sisomicina	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	8×10^6	1×10^8	2×10^8	1×10^9
CTZ+SIS	$1,1 \times 10^5$	$3,74 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	1×10^9	4×10^4	1×10^2
Amicacina	$1,1 \times 10^5$	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2
CTZ+AMC	$1,1 \times 10^5$	1×10^3	$3,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	1×10^2	1×10^2
Gentamicina	$1,1 \times 10^5$	8×10^4	5×10^5	6×10^5	1×10^9	1×10^9
CTZ+GNT	$1,1 \times 10^5$	2×10^5	2×10^4	1×10^2	5×10^4	3×10^5

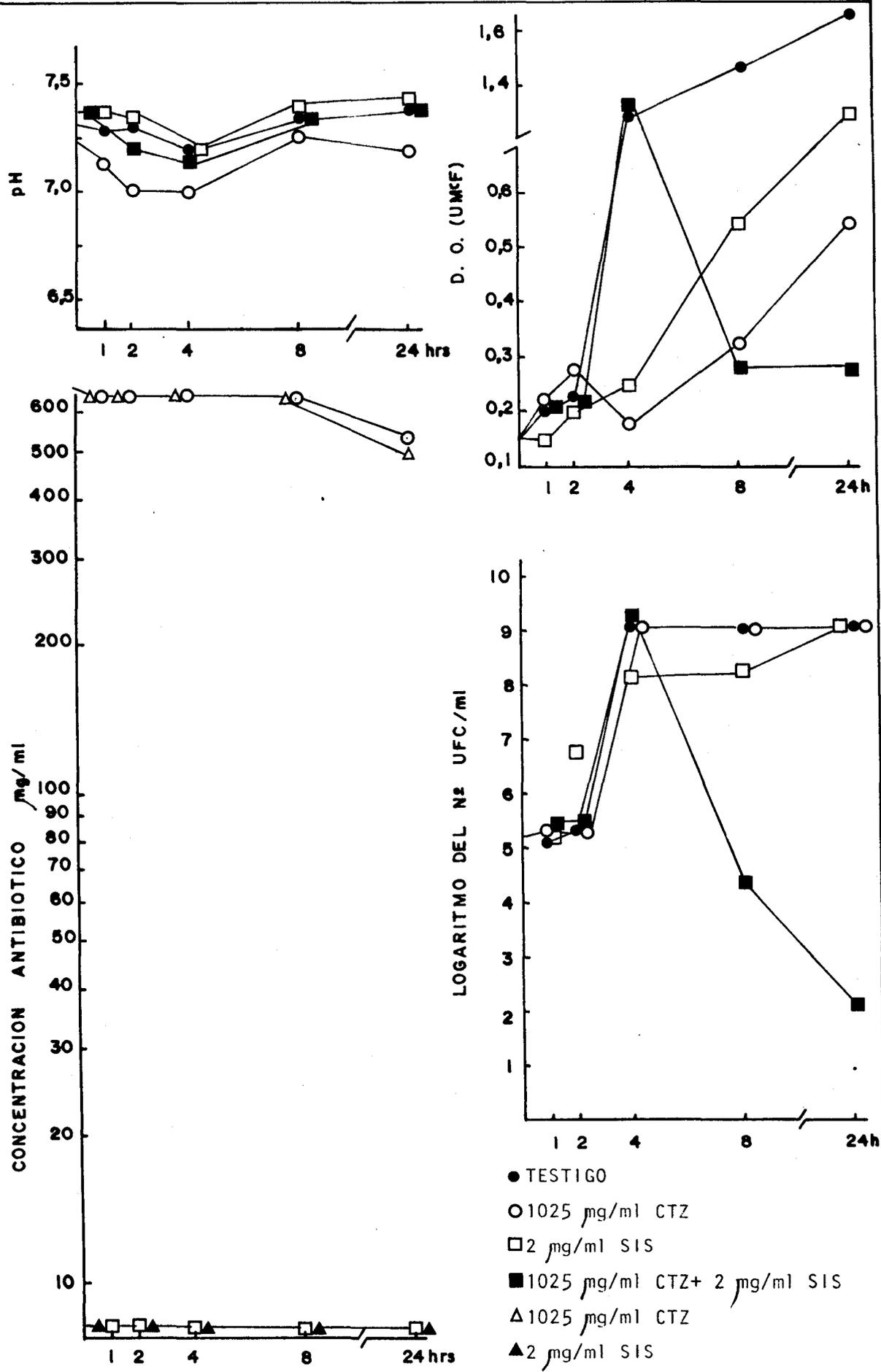


FIGURA 20.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 85, *P. aeruginosa*

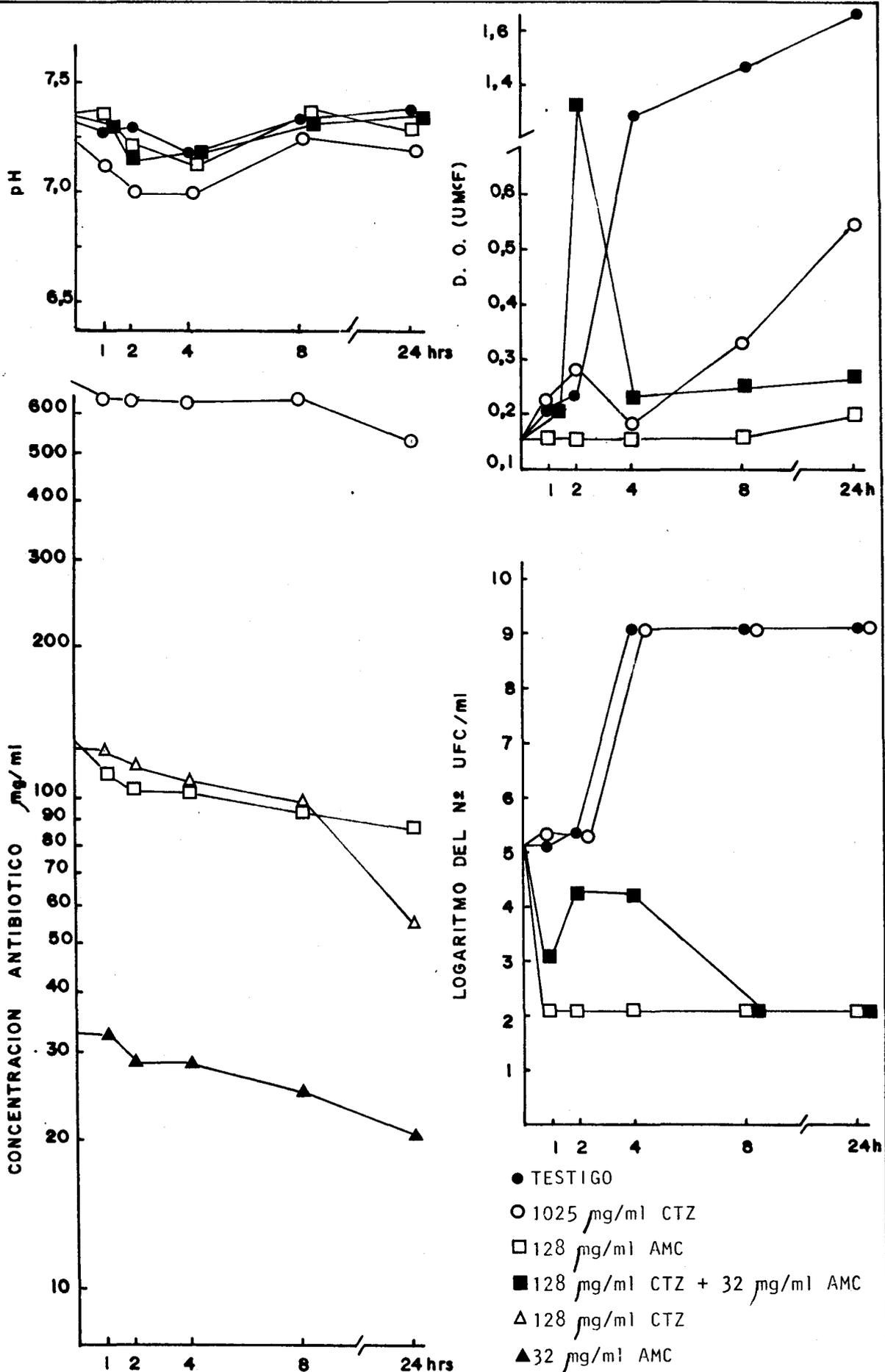
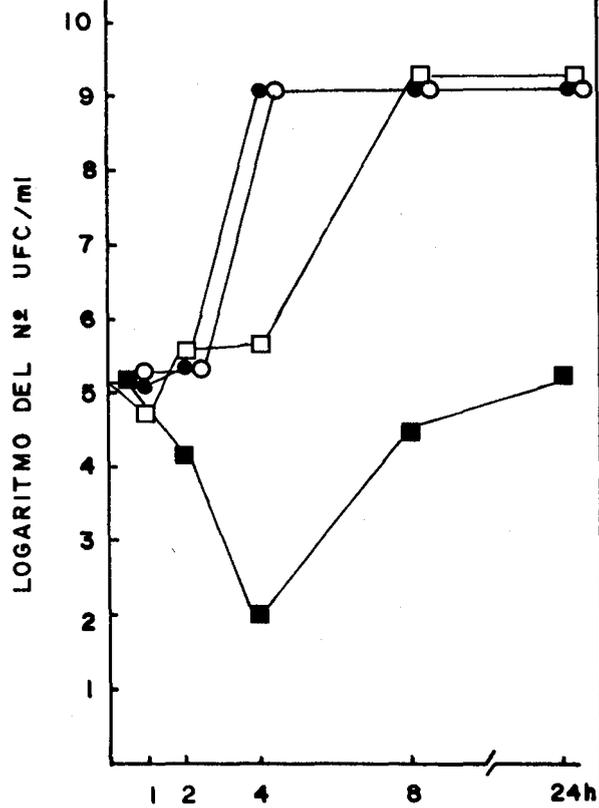
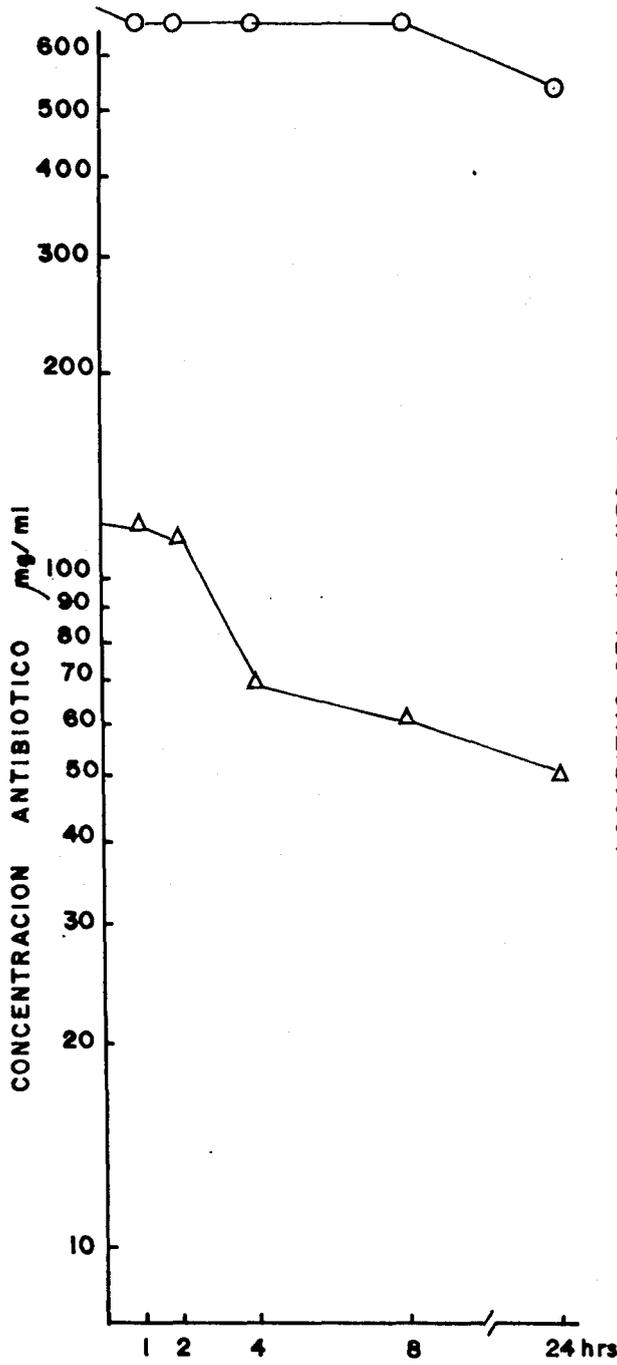
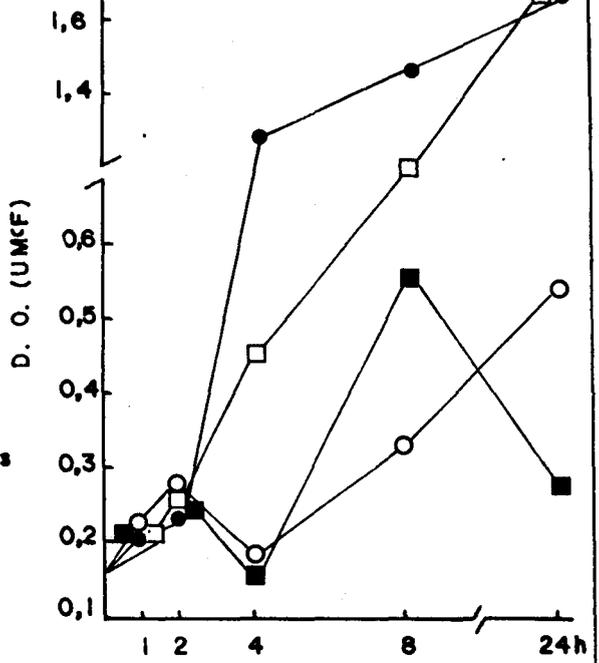
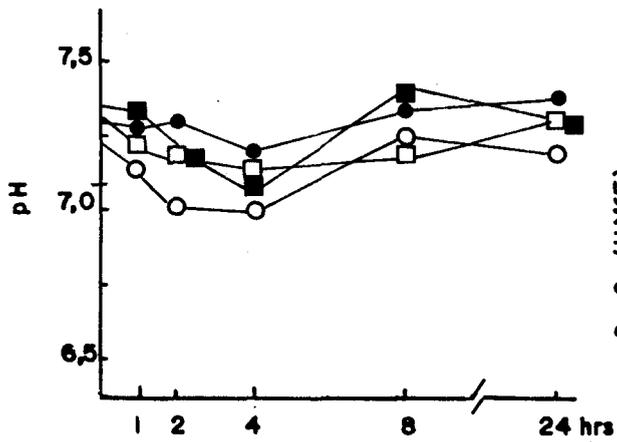


FIGURA 21.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 85, *P. aeruginosa*



- TESTIGO
- 1025 µg/ml CTZ
- 0,5 µg/ml GNT
- 128 µg/ml CTZ + 0,12 µg/ml GNT
- △ 128 µg/ml CTZ
- ▲ 0,12 µg/ml GNT

FIGURA 22.- RESULTADOS DE LA CURVA DE MUERTE DE LA CEPA 35, *P. aeruginosa*

TABLA XXXIV: RESULTADOS DE LA TINCION DE LA CEPA 85.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	BGN	-	-	-	-	-	-	-
1	BGN	Esf	BGN	-	BGN	BGN	BGN	BGN
2	BGN	Esf	BGN	-	-	BGN	BGN	BGN
4	BGN	Esf	BGN	-	BGN	Esf	-	-
8	BGN	Esf	BGN gruesos	-	BGN gruesos	Esf	-	Esf
24	BGN	Esf	BGN gruesos	-	BGN gruesos	Esf	-	Esf

BGN: Bacilos Gram negativos

Esf: Esferoplastos

(-): No se observan bacterias teñidas

TABLA XXXV: VALORES DE TURBIDEZ DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85 (en uMCF).

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS							
	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1	0,20	0,21	0,15	0,15	0,22	0,23	0,20	0,21
2	0,23	0,28	0,20	0,15	0,25	0,23	1,15	0,24
4	1,25	0,18	0,25	0,15	0,45	1,35	0,23	0,15
8	1,45	0,33	0,55	0,15	0,75	0,27	0,25	0,55
24	2,05	0,55	1,14	0,20	1,75	0,27	0,27	0,27

uMCF: Unidad de Mac Farland

TABLA XXXVI: VALORES DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85.

ANTIBIOTICOS

Tiempo (horas)	Testigo	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT
0	7,27	7,20	7,35	7,32	7,30	7,32	7,34	7,36
1	7,28	7,13	7,32	7,32	7,25	7,32	7,31	7,30
2	7,29	7,07	7,30	7,22	7,20	7,22	7,20	7,21
4	7,20	7,05	7,24	7,17	7,17	7,18	7,19	7,13
8	7,30	7,25	7,36	7,38	7,23	7,34	7,30	7,36
24	7,34	7,20	7,38	7,29	7,28	7,35	7,32	7,34

TABLA XXXVII: CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$) EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DE LA CURVA DE MUERTE EN LA CEPA 85.

Tiempo (horas)	ANTIBIOTICOS									
	CTZ	SIS	AMC	GNT	CTZ+SIS	CTZ+AMC	CTZ+GNT			
0	1025	2	128	ND	1025 2	125,6 32	128	ND		
1	1015,4	2	115,6		1019 2	121,2 32	120			
2	665,6	2	106,5		998 1,4	115,9 28,8	115			
4	625,1	1,75	105,6		645 1,1	102,9 28,6	70,4			
8	617,6	1,70	91,2		640 0,8	99,8 25,4	63,2			
24	562,3	1,6	87,7		500 0,7	56,9 20,5	52,6			

TABLA XXXVIII: COMPARACION ENTRE LOS METODOS PARA VALORAR LAS INTERACCIONES ENTRE ANTIBIOTICOS

CEPA	COMBINACIONES DE ANTIBIOTICOS	DILUCION EN CUADRADO	CURVA DE MUERTE	
			CRITERIO A A 4 horas	CRITERIO B a 24 horas
25	CTX	S	A	A
32	CTX	I	A	A
85	SIS + CTX	A	S	A
25	CTZ	I	I	S
32	CTZ	S	I	S
85	CTZ	I	A	S
25	CTX	A	I	I
32	CTX	S	I	I
85	AMC + CTX	A	I	I
25	CTZ	S	I	A
32	CTZ	S	I	A
85	CTZ	S	I	I
25	CTX	S	S	I
32	CTX	I	I	A
85	GNT + CTX	A	S	A
25	CTZ	S	S	A
32	CTZ	I	I	S
85	CTZ	S	S	S

S: sinergia, I: indeterminado, A: antagonismo

4.2.3. Resultados del análisis de la varianza.

4.2.3.1. Recuento del número de UFC.

En la Tabla XXXIX y Figs.23,24,25,26,33 se recogen los resultados.

La diferencia del logaritmo del número de UFC entre las distintas fracciones de tiempo no tomando en consideración las diferencias entre antibióticos, nos muestra comportamiento similar en las cepas 25 y 32, con una cifra global significativa ($p < 0,001$).

El análisis de las diferencias del logaritmo del número de UFC entre las distintas muestras -testigo y tratadas con antibióticos- sin considerar las diferencias por tiempo-muestra valores distintos según las cepas. Sin embargo en las tres podemos destacar que el recuento medio realizado en las muestras tratadas con amicacina, y con sus combinaciones (amicacina más ceftazidima) y (amicacina más cefotaxima) dieron los valores más bajos frente al recuento en el testigo ($p < 0,05$).

La aplicación de la prueba de la varianza permitió valorar la influencia de la hora del recuento y del antibiótico o combinación utilizado. Del estudio realizado en las tres cepas solo se ha encontrado interacciones valorables significativamente en la cepa 85. En la Fig.26 se recoge la comparación del logaritmo de recuento de colonias en los distintos tiempos, para cada antibiótico solo o en combinación.

Del estudio del crecimiento bacteriano en el tiempo y la influencia del tratamiento con antibiótico podemos destacar:

a) La amicacina disminuye el número de UFC desde la primera hora a las 24 horas en cifras significativas ($p < 0,05$) respecto al valor del recuento en el momento inicial.

b) Se observa aumento significativo ($p < 0,05$) del número de UFC a las 24 horas, respecto del valor del recuento en el momento inicial (hora cero) en las preparaciones siguientes: El testigo, las tratadas con: (cefotaxima más sisomicina), (cefotaxima más gentamicina), ceftazidima, (ceftazidima más gentamicina), sisomicina y gentamicina.

c) Con la mayor parte de los antibióticos utilizados los efectos bactericidas se manifiestan en las primeras cuatro horas, sin embargo en la combinación ceftazidima más sisomicina, se manifiesta más a las ocho y a las 24 horas.

La valoración del logaritmo del recuento de UFC realizados por intervalos de tiempo comparando los ensayos tratados con distintos antibióticos, solos o en combinación, se recogen en las Figs.26 y 33. De ello destacamos lo siguiente:

Primera hora.

a) Solo en las preparaciones tratadas con amicacina se observa disminución significativa en el logaritmo del número de UFC en relación con el testigo ($p < 0,05$).

b) También es significativa ($p < 0,05$) en relación con las combinaciones (ceftazidima más gentamicina), (ceftazidima más sisomicina) y (cefotaxima más amicacina).

Segunda hora.

a) Respecto del testigo se observa disminución significativa del logaritmo del número de UFC ($p < 0,05$) en las siguientes preparaciones: Las tratadas con amicacina, (cefotaxima más amicacina), (ceftazidima más amicacina), (ceftazidima más gentamicina), (cefotaxima más gentamicina) y (cefotaxima más sisomicina).

A las cuatro horas.

Se observa disminución significativa del logaritmo del número de UFC, respecto del testigo ($p < 0,05$) en las preparaciones tratadas con: amicacina, (cefotaxima más amicacina), (ceftazidima más amicacina), (cefotaxima más gentamicina), (ceftazidima más gentamicina).

A la octava hora.

Se observa disminución significativa del logaritmo del número de UFC, respecto del testigo ($p < 0,05$) las preparaciones tratadas con: amicacina, (cefotaxima más amicacina), (ceftazidima más amicacina), (ceftazidima más gentamicina), (ceftazidima más sisomicina).

A las veinticuatro horas.

Los resultados son iguales a los señalados en la octava hora. El logaritmo del recuento de UFC en las preparaciones tratadas con amicacina sola o en combinación, fué inferior significativamente ($p < 0,05$) al medido en las horas 2^a, 4^a, 8^a y 24^a, de las preparaciones tratadas con cualquier otro antibiótico solo.

No se produce disminución significativa en el logaritmo del número de UFC en relación con el testigo en ninguna de las horas estudiadas en las preparaciones tratadas con: cefotaxima, ceftazidima, sisomicina, gentamicina, solos.

4.2.3.2. Turbidez.

En las Figs.27,28,29 y Tabla XL se recoge el resultado de aplicar las pruebas de varianza en la valoración de la turbidez media, considerando la interacción tiempo-antibióticos. El estudio de las interacciones dió valores significativos ($p < 0,001$) en las tres cepas de estudio. De él destacamos lo siguiente: La turbidez media de todos los ensayos es significativamente más alta ($p < 0,05$) en todos los casos, en las últimas fracciones de tiempo elegidas para la valoración de las muestras (8 y 24 horas) en relación a las primeras (1 y 2 horas).

En la cepa 25 se pone de manifiesto que la turbidez media es significativamente más alta cuanto más tiempo transcurre ($p < 0,05$).

En esta misma cepa la turbidez media a lo largo del tiempo es significativamente mayor ($p < 0,05$) en el testigo y en las muestras tratadas con cefotaxima y con ceftazidima.

En la cepa 32 además de estar elevada la turbidez media en esas muestras lo está también en las tratadas con (ceftazidima más sisomicina).

En la cepa 85, solo el testigo presenta turbidez media elevada significativamente ($p < 0,05$), frente a más de la mitad de las

muestras tratadas con antibióticos.

4.2.3.3. pH.

De las Figs. 30,31,32 y Tablas XLI, en donde se recogen las interacciones del tipo de antibiótico o combinación, y el tiempo, se destaca lo siguiente:

En la cepa 25 el valor del pH medio (de todas las muestras tratadas y del testigo) es significativamente superior a las 24 horas ($p < 0,05$) si se compara con los obtenidos en cada una de las fracciones de tiempos precedentes.

El pH medio medido a las 8 horas es significativamente superior ($p < 0,05$) al medido a las 4^a, 2^a y 1^a horas.

En las otras cepas -32 y 85- ese mismo estudio sobre las diferencias de pH en las distintas horas, no dió valores significativos.

Comparando los valores de pH medio a lo largo del tiempo, en muestras tratadas con diferentes antibióticos o combinaciones y con el testigo destacamos lo siguiente:

Cepa 25.

Los valores de pH medio del testigo fueron significativamente superiores al de todas las muestras ($p < 0,05$), excepto a las tratadas con cefotaxima y amicacina.

Los valores de pH medio en las muestras tratadas

con sisomicina y gentamicina, fueron significativamente inferiores a las restantes ($p < 0,05$).

Cepa 32.

El valor del pH medio del testigo es significativamente superior ($p < 0,05$) a una parte de las otras muestras y significativamente inferior a las restantes ($p < 0,05$).

Cepa 85.

Respecto al valor del pH medio del testigo se destaca que no presenta diferencias significativas respecto al de la mayor parte de las muestras.

TABLA XXXIX: RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DEL LOGARITMO DEL NUMERO DE UFC.

CEPA 25

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	206,5894	14	14,75638	6,3087	$p < 0,001$
Tiempo	56,92603	5	11,38521	4,86745	$p < 0,001$
Interacción	4,698383	1	4,698383	2,00846	N.S.
Error	161,3942	69	2,339046		

CEPA 32

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	232,8001	14	16,62857	7,3956	$p < 0,001$
Tiempo	98,45215	5	19,69043	8,75744	$p < 0,001$
Interacción	6,909405	1	6,909405	3,03730	N.S.
Error	155,1411	69	2,248422		

CEPA 85

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	268,5259	14	19,18042	10,755348	$p < 0,001$
Tiempo	26,36475	5	5,272949	2,956786	N.S.
Interacción	63,15718	1	63,15718	35,415	$p < 0,001$
Error	123,0503	69	1,783338		

TABLA XL: RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA TURBIDEZ

CEPA 25

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	0,8382013	14	5,987152E-02	24,93399	p < 0,001
Tiempo	0,7050917	5	0,1410184	58,740796	p < 0,001
Interacción	2,59297	1	2,59297	1071,41986	p < 0,001
Error	0,1669886	69	2,420125E-03		

CEPA 32

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	1,439187	14	0,1027991	7,77844	p < 0,001
Tiempo	0,8046794	5	0,1609359	121,7744	p < 0,001
Interacción	1,831952	1	1,831952	138,6172	p < 0,001
Error	0,9119024	69	1,321598E-02		

CEPA 85

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	1,705797	14	0,1218427	2,003939	p < 0,05
Tiempo	5,700568	5	1,140114	18,751382	p < 0,001
Interacción	2,765169	1	2,765169	45,4785	p < 0,001
Error	4,195312	69	6,080162E-02		

TABLA XLI: RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DEL pH.

CEPA 25

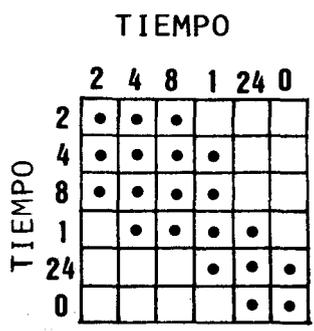
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	0.5942383	14	0,0424456	7,566735	p < 0,001
Tiempo	0,1186524	5	2,373047E-02	4,2303949	p < 0,01
Interacción	9,849191E-03	1	9,849191E-03	1,771118	N.S.
Error	0,3837055	69	5,56095E-03		

CEPA 32

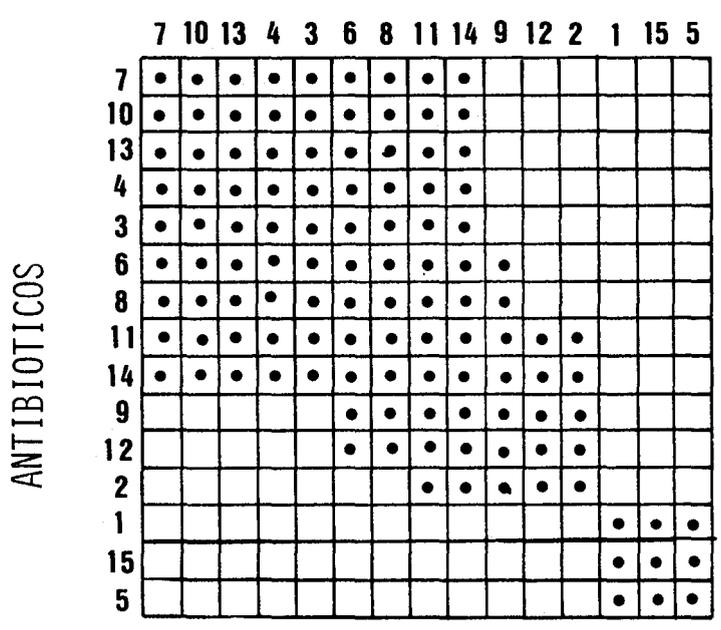
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	0,4809571	14	3,435407E-02	16,66456	p < 0,001
Tiempo	1,806641E-02	5	3,613281E-03	1,752704	N.S.
Interacción	7,992073E-02	1	7,992073E-02	38,768	p < 0,001
Error	0,1422472	69	2,061554E-03		

CEPA 85

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F. EXPERIMENTAL	SIGNIFICACION
Antibiótico	0,7553711	14	5,395508E-02	700,16974	p < 0,01
Tiempo	0,0522461	5	1,044922E-02	1,35	N.S.
Interacción	1,759638E-02	1	1,759638E-02	2,2831	N.S.
Error	0,5317201	69	7,706088E-03		



ANTIBIOTICOS

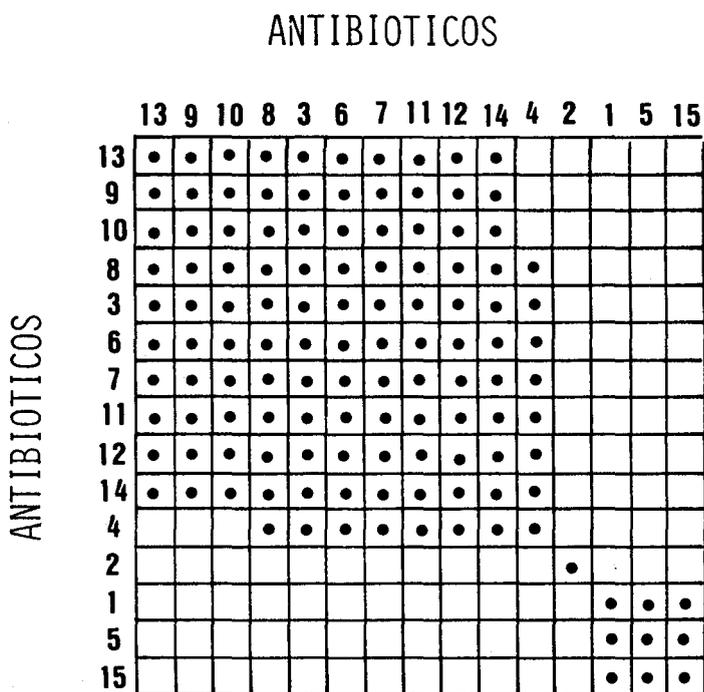
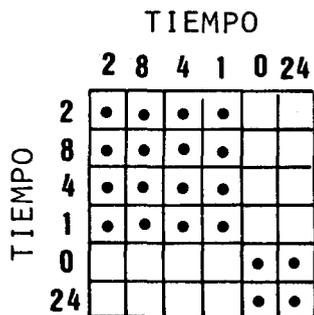


- SIGNIFICATIVO ($p < 0,05$)
- NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 23.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO LOG. DEL NO DE UFC EN LA CEPA 25. ARRIBA: DIFERENCIAS ENTRE TIEMPOS. ABAJO: DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS.

Significado de los números utilizados en estas Figuras, con referencia a los antibióticos.

1	Cefotaxime	CTX	
2	"	+ Sisomicina	CTX+SIS
3	"	+ Amicacina	CTX+AMC
4	"	+ Gentamicina	CTX+GNT
5	Ceftazidime	CTZ	
6	"	+ Sisomicina	CTZ+SIS
7	"	+ Amicacina	CTZ+AMC
8	"	+ Gentamicina	CTZ+GNT
9	Sisomicina	SIS	(2 $\mu\text{g/ml}$)
10	Amicacina	AMC	(128 $\mu\text{g/ml}$)
11	Gentamicina	GNT	(1 $\mu\text{g/ml}$)
12	Sisomicina	SIS	(2 $\mu\text{g/ml}$)
13	Amicacina	AMC	(128 $\mu\text{g/ml}$)
14	Gentamicina	GNT	(0,5 $\mu\text{g/ml}$)
15	Testigo		

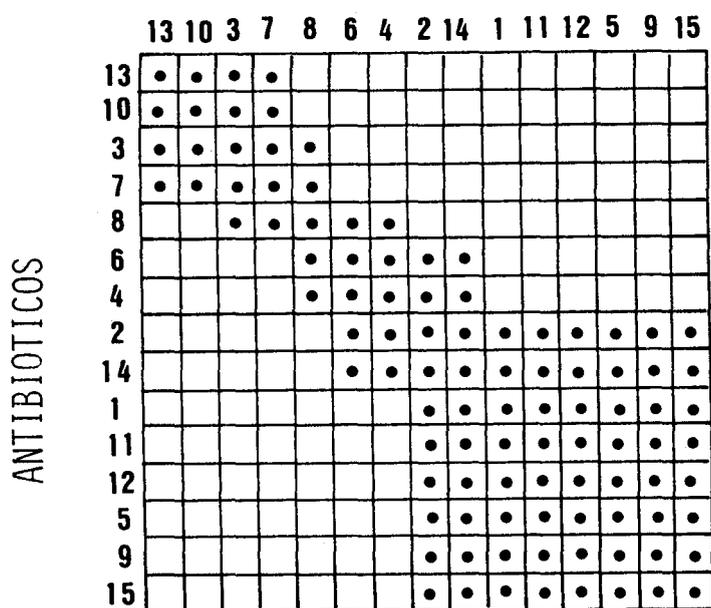


SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)

NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 24.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO LOG. DEL NO DE UFC EN LA CEPA 32. ARRIBA: DIFERENCIAS ENTRE TIEMPOS. ABAJO: DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS.

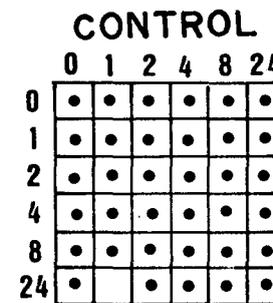
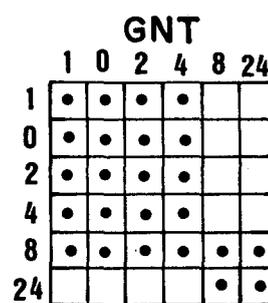
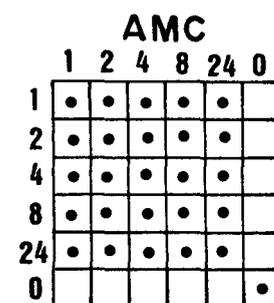
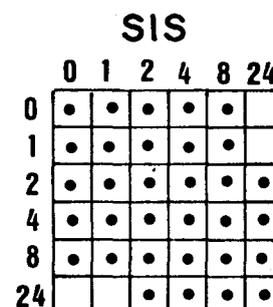
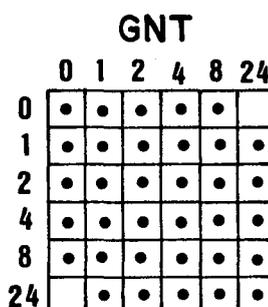
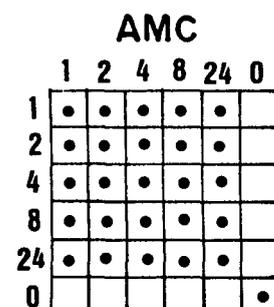
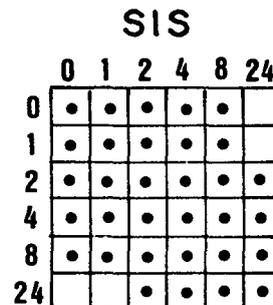
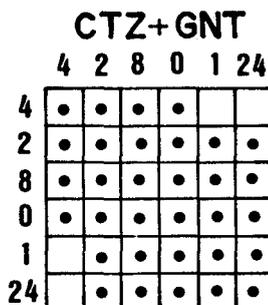
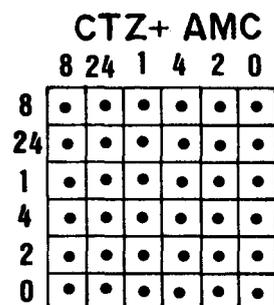
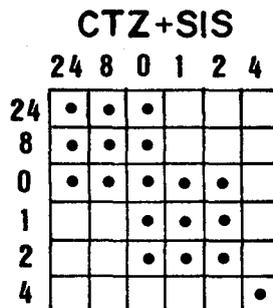
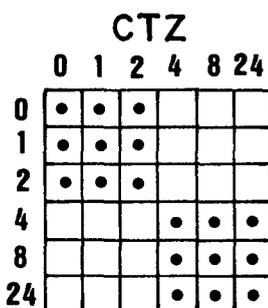
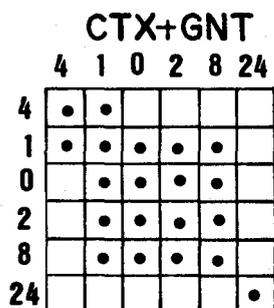
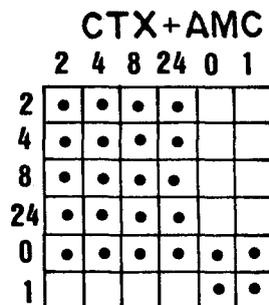
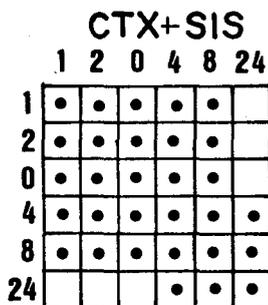
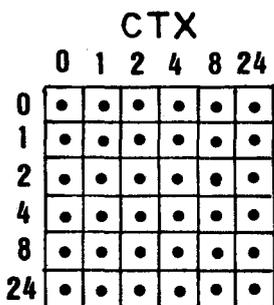
ANTIBIOTICOS



SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)

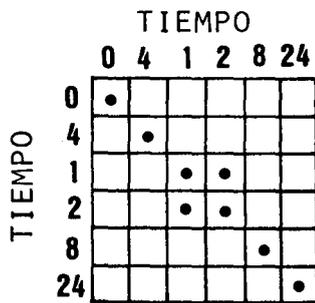
NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 25.- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LA DIFERENCIAS DE MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO LOG. DEL N° DE UFC. SE VALORAN LAS DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS, EN LA CEPA 85.

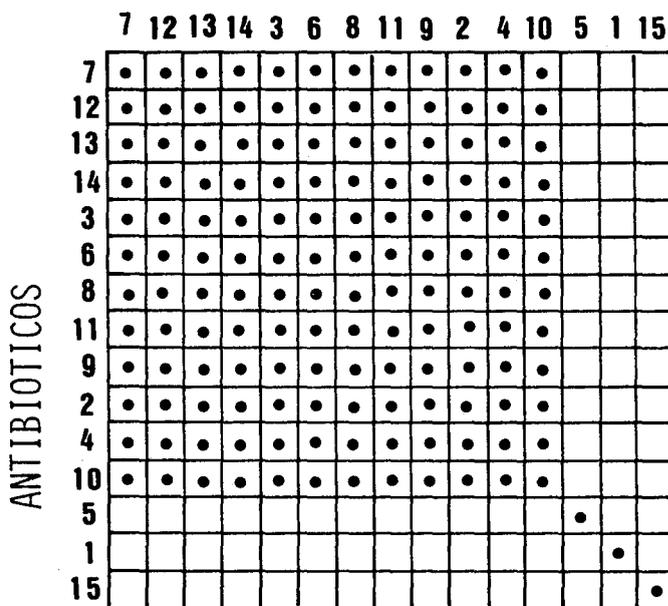


◻ NO SIGNIFICATIVO ◻ SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)

FIGURA 26.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO LOG. DEL N° DE UFC EN LAS INTERACCIONES TIEMPO/ANTIB. CEPA 85.

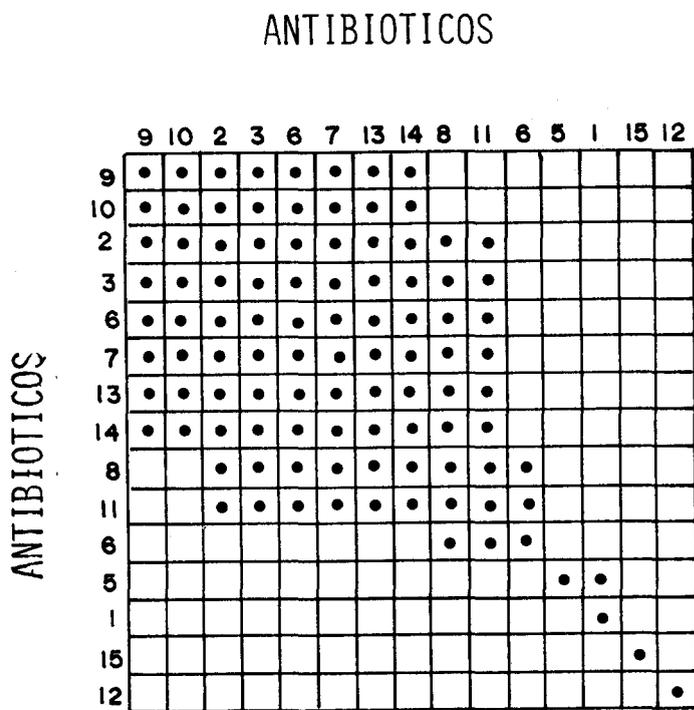
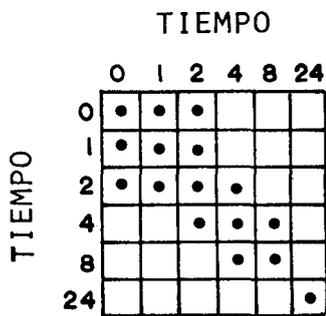


ANTIBIOTICOS



- SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)
- NO SIGNIFICATIVO

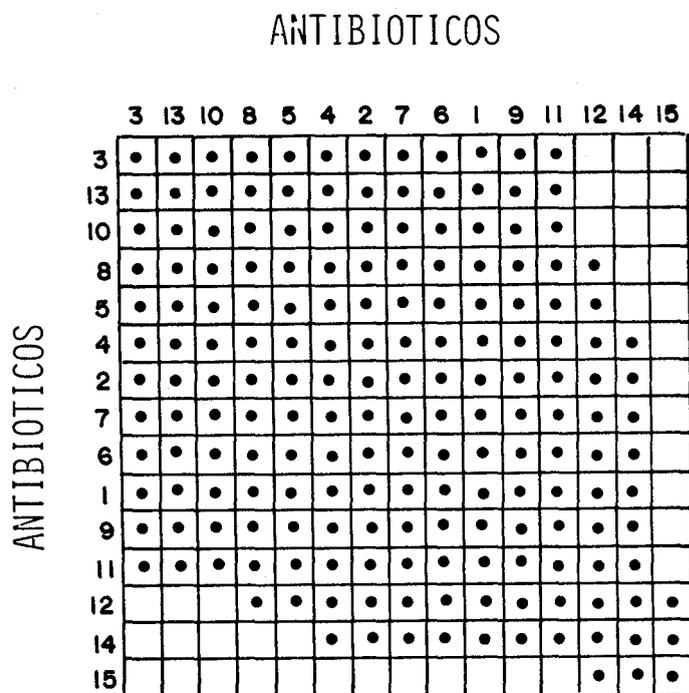
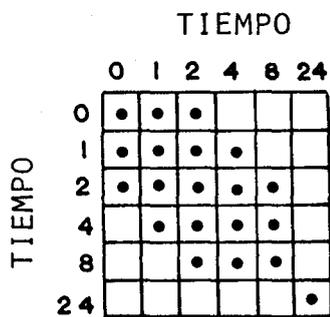
FIGURA 27.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO TURBIDEZ EN LA CEPA 25. ARRIBA DIFERENCIAS ENTRE TIEMPOS. ABAJO DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS.



SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)

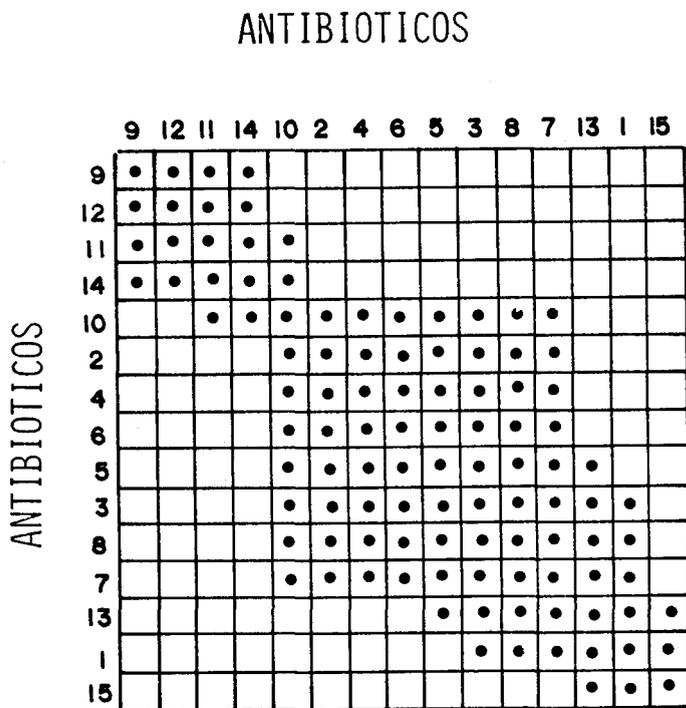
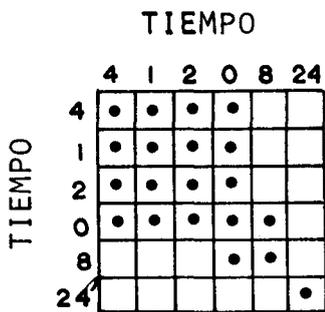
NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 28.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO TURBIDEZ EN LA CEPA 32. ARRIBA DIFERENCIA ENTRE TIEMPOS. ABAJO DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS.



- SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)
- NO SIGNIFICATIVO

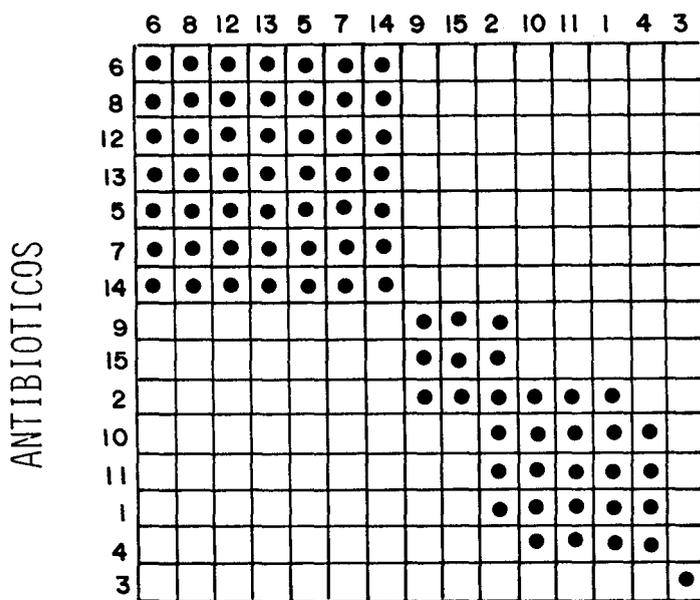
FIGURA 29.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO TURBIDEZ EN LA CEPA 85. ARRIBA DIFERENCIAS ENTRE TIEMPOS. ABAJO DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS.



- SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)
- NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 30.- DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO pH EN LA CEPA 25. ARRIBA DIFERENCIAS ENTRE TIEMPOS. ABAJO DIFERENCIAS ENTRE ANTIBIOTICOS.

ANTIBIOTICOS



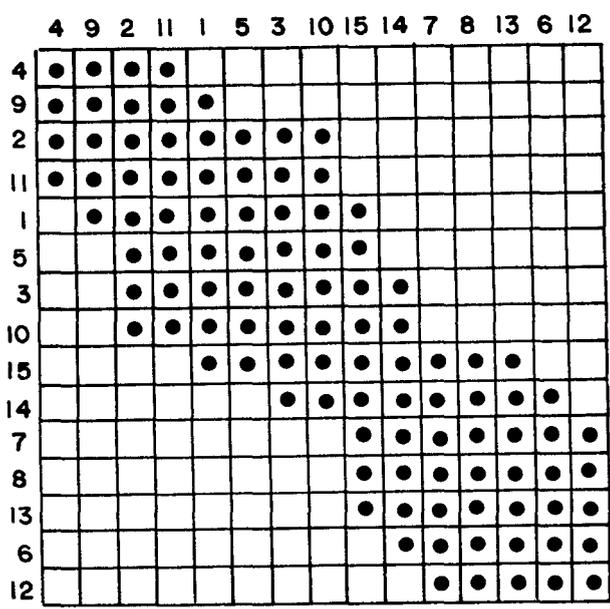
ANTIBIOTICOS

- SIGNIFICATIVO ($p < 0,05$)
- NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 31.- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO PH ENTRE ANTIBIOTICOS, EN LA CEPA 32.-

ANTIBIOTICOS

ANTIBIOTICOS



□ SIGNIFICATIVO ($P < 0,05$)

● NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 32.- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA EN EL PARAMETRO PH ENTRE ANTIBIOTICOS, EN LA CEPA 85.-

4.2.4. Resultados del estudio de regresión.

En las Tablas XLII, XLIII, XLIV, XLV, XLVI, XLVII, se recogen los resultados expresados en grado de significación estadística de las relaciones lineales entre los siguientes parámetros:

- Log del N° de UFC - Turbidez (Tabla XLII).
- Log.del N° de UFC - Tiempo (Tabla XLIII).
- Turbidez - Tiempo (Tabla XLIV).
- pH - Tiempo (Tabla XLV).
- Log.del N° de UFC - pH (Tabla XLVI).
- Log.del N° de UFC - Nivel de antibióticos (Tabla XLVII).

TABLA XLII: GRADOS DE SIGNIFICACION DEL ANALISIS DE REGRESION. LOG.DEL N° UFC - TURBIDEZ.

ANTIBIOTICOS

CEPA	CTX	CTX + SIS	CTX + AMC	CTX + GNT	CIZ	CIZ + SIS	CIZ + AMC	CIZ + GNT	SIS	AMC	GNT	GNT*
25	p<0,0025	-	p<0,03	p<0,05	-	p<0,05	-	-	-	p<0,009	-	-
32	p<0,0025	p<0,05	-	-	-	-	-	-	p<0,01	-	-	-
85	-	p<0,01	-	p<0,01	-	p<0,05	-	-	p<0,05	-	p<0,05	p<0,01

* GNT: A concentración 1/4 de GNT.

TABLA XLIII: GRADOS DE SIGNIFICACION DEL ANALISIS DE REGRESION. LOG.DEL N° UFC - TIEMPO.

ANTIBIOTICOS

CEPA	CIX	CIX + SIS	CIX + AMC	CIX + GNT	CTZ	CTZ + SIS	CTZ + AMC	CTZ + GNT	SIS	AMC	GNT	GNT*
25	p<0,0005	-	-	-	p<0,0005	-	-	-	p<0,02	-	-	-
32	p<0,05	p<0,005	-	-	p<0,05	-	-	-	p<0,05	-	-	-
85	p<0,05	p<0,0025	-	p<0,05	-	-	-	-	p<0,05	-	p<0,01	p<0,05

*GNT: A concentración 1/4 de GNT.

TABLA XLIV: GRADOS DE SIGNIFICACION DEL ANALISIS DE REGRESION. TURBIDEZ-TIEMPO.

ANTIBIOTICOS

CEPA	CTX	CTX + SIS	CTX + AMC	CTX + GNT	CTZ	CTZ + SIS	CTZ + AMC	CTZ + GNT	SIS	AMC	GNT	GNT*
25	$p < 0,0025$	-	-	-	$p < 0,0025$	$p < 0,03$	-	$p < 0,05$	-	-	-	-
32	$p < 0,0025$	$p < 0,0005$	-	-	$p < 0,0025$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	-	$p < 0,0025$	-	-	-
85	$p < 0,0005$	$p < 0,005$	-	$p < 0,0005$	$p < 0,0025$	-	-	-	$p < 0,0005$	$p < 0,0025$	$p < 0,0025$	$p < 0,0005$

* GNT: A concentración 1/4 de GNT.

TABLA XLV: GRADOS DE SIGNIFICACION DEL ANALISIS DE REGRESION. pH - TIEMPO.

ANTIBIOTICOS

CEPA	CIX	CIX + SIS	CIX + AMC	CIX + GNT	CIZ	CIZ + SIS	CIZ + AMC	CIZ + GNT	SIS	AMC	GNT	GNT*
25	$p < 0,0025$	-	-	-	$p < 0,05$	-	-	-	-	$p < 0,04$	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$p < 0,05$	$p < 0,05$	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* GNT: A concentración 1/4 de GNT

TABLA XLVI: GRADOS DE SIGNIFICACION DEL ANALISIS DE REGRESION. LOG. DEL N° UFC - pH

ANTIBIOTICOS

CEPA	CIX	CIX + SIS	CIX + AMC	CIX + GNT	CIZ	CIZ + SIS	CIZ + AMC	CIZ + GNT	SIS	AMC	GNT	GNT*
25	p<0,0025	-	-	-	p<0,05	-	-	p<0,05	-	p<0,05	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	p<0,05	-	p<0,0025	-
85	-	-	-	-	-	-	-	p<0,01	-	-	-	-

* GNT: A concentración 1/4 de GNT.

TABLA XLVII: GRADOS DE SIGNIFICACION DEL ANALISIS DE REGRESION. LOG. DEL N°UFC - NIVEL DE ANTIBIOTICOS.

ANTIBIOTICOS

CEPA	CIX	CIX + SIS	CIX + AMC	CIX + GNT	CIZ	CIZ + SIS	CIZ + AMC	CIZ + GNT	SIS	AMC	GNT	GNT*
25			$p < 0,003^C$ y $p < 0,006_A$	$p < 0,05^C$ y $p < 0,03_G$						$p < 0,04$		$p < 0,01$
32	$p < 0,0025$	$p < 0,005$	$p < 0,01$						$p < 0,025$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	
85			$p < 0,05$							$p < 0,05$		

*GNT: A concentración 1/4 de GNT.

5. DISCUSSION

5.1. SENSIBILIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS.

Los problemas que plantean las infecciones causadas por P.aeruginosa ha motivado la búsqueda de nuevas pautas terapéuticas, tanto para intentar obviar la aparición de cepas resistentes como para intentar tratar las infecciones por cepas multirresistentes (32,40,48,52,138,140).

En una primera parte de nuestro trabajo hemos estudiado la actividad de nueve antibióticos -seis betalactámicos más tres aminoglicósidos- sobre 100 cepas de P.aeruginosa. Como los efectos de algunos de estos antibióticos sobre otras cepas de P.aeruginosa ya había sido estudiado por otros autores (14,24,113,121,149) nos ha parecido de interés comparar los valores de las CMI_{50} y CMI_{90} obtenidos por nosotros con la de ellos para conocer la diferente sensibilidad de este microorganismo aislado en nuestro medio hospitalario. Partiendo de los resultados de los efectos de antibióticos utilizados comentaremos a continuación los obtenidos utilizando combinaciones de betalactámicos y aminoglicósidos seleccionados.

Los antibióticos más activos fueron imipenema y ceftazidima que presentaron los valores más bajos de CMI_{50} 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, y CMI_{90} 4 $\mu\text{g/ml}$ para ambos.

La razón de la mayor actividad de la imipenema parece explicarse (122) por la particular estructura química, determinada por un cambio de lugar en el 6-alfa-hidroxietyl, que le confiere mayor resistencia a las beta-lactamasas tipo 1d de P.aeruginosa y a la ausencia de un átomo de azufre en el anillo secundario. Por otra parte, NEU (108) ha señalado que la imipenema es activa sobre todas las bacterias resistentes a ampicilina, cefamandol, cefoxitina, ticarcilina, cefoperazona, cefsulodin y ceftazidima. Las CMI_{50} y CMI_{90} obtenidas por nosotros para este último

antibiótico son idénticas a las encontradas por GOBERNADO (42), ROMAGNOLI (122) y superior en una dilución a los de CORRADO (16), SKALOVA (134).

CLUMECK afirma que ceftazidima tiene una buena actividad "in vitro" frente a P.aeruginosa y posee una alta estabilidad frente a las beta-lactamasas. Por esas características, por tener una vida media larga (1,3- 1,8 hora) y una escasa capacidad de unirse a proteínas (17%) (44), algunos autores BOUZA (10), CLUMECK (17), GOZZARD (43), NEU (107), ROLSTON (121) la proponen como una vía alternativa en el tratamiento de infecciones graves. En el mismo sentido están nuestros resultados. Nuestros valores de sensibilidad son comparables a los de DUGUID (20) ENG (24), GOBERNADO (42), diferenciándose en escasas diluciones (1 ó 2) de los encontrados por GOBERNADO (42), ROLSTON (121).

La cefotaxima no mostró una acción bactericida importante sobre los microorganismos estudiados (CMI_{50} : 4 $\mu\text{g/ml}$ y CMI_{90} : 32 $\mu\text{g/ml}$). Otros autores obtienen valores superiores en dos diluciones a los nuestros CHANDRASEKAR (14), GOBERNADO (42), WISE (148), aunque fué más activa que las otras dos cefalosporinas de la tercera generación YU (158) y también que la carbenicilina, como han demostrado WISE y cols. (148), NEU y cols. (107) y BARRY y cols (5) consideran que este antibiótico podría utilizarse en algunas infecciones producidas por P.aeruginosa, siempre que se alcance en el lugar de la infección una concentración superior a 32 $\mu\text{g/ml}$.

Nuestros resultados apoyan lo mantenido por NAMEE (101), que ninguna cefalosporina de la tercera generación presenta suficiente actividad bactericida frente a P.aeruginosa como para poder usarse sola, como se ha venido haciendo en pacientes con septicemias o

granulocitopénicos. Con los valores de CMI encontrados por nosotros tampoco podría ser recomendadas, la única excepción es ceftazidima.

La azlocilina es una penicilina con actividad antipseudomonas, pero inestables a las betalactamas CAMI (13). Los valores de CMI₅₀ (8 µg/ml) y CMI₉₀ (128 µg/ml) obtenidos por nosotros frente a P.aeruginosa coinciden con los encontrados por PEREA y cols (113) cuando estudia la actividad de este antibiótico frente a cepas de P.aeruginosa sensibles y resistentes a carbenicilina. Sin embargo los encontrados por otros autores presentan diferencias respecto a las nuestras. Mientras que coincidimos en la CMI₅₀, la CMI₉₀ es tres diluciones superior a la de MOODY (99); otros sin embargo obtienen una CMI₅₀ inferior y CMI₉₀ superior (14,52). La misma actividad bactericida presentaron cefoperazona y el moxalactam. Ambos mostraron los valores más altos de CMI₅₀ (16 µg/ml) y CMI₉₀ (64 µg/ml) de los seis betalactámicos ensayados. Sin embargo algunos autores obtienen cifras diferentes de CMI para la cefoperazona (ENG (24), HALL (54), NEU (108), SOSNA (135) que en la mayor parte de casos citados se podría explicar por las variaciones regionales en la susceptibilidad de P.aeruginosa aisladas de sujetos inmunocomprometidos, previamente tratados con antibióticos y frecuentemente infectados con organismos más resistentes.

Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de moxalactam encontradas por nosotros son similares a los publicados por otros autores (GREENWOOD (50), KURTZ (77), WISE (149). NEU (107) ya había observado que este antibiótico tenía poca actividad bactericida sobre P.aeruginosa que parece inactivarlo por acción de betalactamas. En este mismo sentido se interpretan los resultados de BARRY (5), y las nuestras.

En relación con la sensibilidad de los aminoglicósidos estudiados (sisomicina, ampicacina, gentamicina) nuestros resultados han mostrado que

la CMI₉₀ es igual para los tres (128 µg/ml), mientras que las CMI₅₀ se diferencian entre sí en una dilución. La sisomicina fué la más activa de los tres (CMI₅₀ 4 µg/ml). Estos resultados coinciden con los encontrados por PEREA y cols (113), ROSLTON y cols (121), MARKS y cols (128) comprobaron que este antibiótico era eficaz en el 40% de cepas de P.aeruginosa, resistentes a gentamicina. En la misma línea está el estudio de WAITZ y cols (143) que "in vivo" observan que la sisomicina era más activa que gentamicina, kanamicina y tobramicina.

La valoración de la actividad de amicacina nos ha mostrado que las cifras de CMI₅₀ (16 µg/ml) y CMI₉₀ son ligeramente superiores a las publicadas por la mayoría de autores (BARRY (5), CHANDRASEKAR (14), KURTZ (76), NEU (108). Algunos que obtuvieron valores de CMI inferiores a los nuestros, lo consideran el aminoglicósido más activo contra P.aeruginosa, señalando que solo se inactiva por uno de los enzimas que actúan sobre los antibióticos de este grupo (PEREA (113), ROLSTON (121).

En la valoración de las CMI₅₀ y CMI₉₀ de gentamicina obtuvimos cifras iguales (CHANDRASEKAR (14), GREENWOOD (50) o ligeramente superiores (ENG (24), GWYNN (52), WISE (148) a las de otros autores. Creemos que la causa de esta mayor resistencia se debe a la gran utilización de este antibiótico en nuestro medio hospitalario y extrahospitalario. Pues aunque este antibiótico se recomendó en principio para el tratamiento de infecciones en sujetos neutropénicos ROBERTS (119), sin embargo se ha venido haciendo un uso excesivo del mismo, incluso en infecciones banales.

De los resultados expuestos podemos afirmar que de los antibióticos ensayados los más activos han sido la imipenema y la ceftazidima. El resto han mostrado unos valores de CMI elevados sobre las cien cepas estudiadas de P.aeruginosa. Por ello creemos que no es aconsejable su

uso clínico porque se necesitaría utilizar dosis altas para ser efectivos que con frecuencia serían tóxicas para el sujeto.

5.2. INTERACCIONES DE ANTIBIOTICOS CON DISTINTOS METODOS.

Para el estudio de la interacción entre antibiótico los métodos seguidos han sido la técnica de dilución en cuadrado y la curva de muerte en medio líquido. Con el primero de ellos se han estudiado los efectos de las combinaciones de los seis betalactámicos con los tres aminoglicósidos sobre cien cepas de P.aeruginosa. El segundo método se ha utilizado para valorar la acción bactericida de las combinaciones de dos betalactámicos -cefotaxima y ceftazidima- con los tres aminoglicósidos, sobre tres cepas de P.aeruginosa. Estas fueron seleccionadas atendiendo a la respuesta observada previamente de los antibióticos en medio sólido sobre cada una de las cien cepas aplicando el primer método.

Con la -técnica de dilución en cuadrado- en medio sólido las combinaciones de amicacina con todos los betalactámicos fueron las de mayor efecto sinérgico, siendo el de máximo rango la formada por amicacina con moxalactam (93%). Utilizando combinaciones de este aminoglicósido con otros betalactámicos, distintos a los ensayados por nosotros, algunos autores han obtenido resultados similares (41,77,129,-152). También observamos que los efectos de "antagonismo" e "indeferencia" con esta combinación fueron mínimos, mientras que el efecto "favorable" fué máximo.

La combinación de amicacina con ceftazidima inhibió sinérgicamente (88%) de las cepas estudiadas. HOOTON (59) obtiene un efecto sinérgico muy inferior al nuestro (29%). Afirma que el escaso efecto sinérgico es

consecuencia exclusiva de una menor sensibilidad con una mayor CMI₉₀ del betalactámico. Sin embargo en nuestros resultados se produce un efecto sinérgico alto con una baja CMI₉₀ (4 µg/ml) de ceftazidima.

Los menores porcentajes de sinergia los observamos con las combinaciones de todos los aminoglicósidos con cefoperazona y dentro de los primeros con sisomicina (27%). Este dato no puede ser comparado con los de otros autores por no haber encontrado ninguna referencia en la bibliografía consultada acerca de esta combinación. Nos llama la atención que este aminoglicósido, el más activo utilizado solo, sea el menos sinérgico en combinación.

La adición globalmente considerada fué superior al diez por ciento para todas las combinaciones de sisomicina más betalactámicos. Los efectos superiores de adición se obtuvieron con la combinación gentamicina más imipenema (25%). Este betalactámico, que fué el más activo de todos los ensayados cuando se utilizó solo, mostró poca actividad sinérgica en combinación con gentamicina (57%) aunque con los otros dos aminoglicósidos mostró valores sinérgicos superiores al 80%.

La indiferencia se observó con mayor frecuencia en las combinaciones de todos los aminoglicósidos con cefoperazona, siendo mayor la indiferencia cuando ésta se combinó con sisomicina (33%).

Destacamos los reducidos efectos antagónicos obtenidos en las combinaciones de los antibióticos estudiados. El mayor efecto relativo lo observamos con la combinación de cefoperazona más gentamicina (17%).

En un porcentaje pequeño de cepas (9%) no se pudo valorar el efecto de la combinación de la sisomicina con el cefotaxima, por no ajustarse a los criterios requeridos para determinar su comportamiento.

5.3. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS CURVAS DE MUERTE.

5.3.1. Modificaciones de la población bacteriana.

Observando los resultados que recogemos en la Tabla XXXVIII podemos afirmar que varias combinaciones de antibióticos, en particular aquellas formadas por gentamicina, muestran efectos sinérgicos según el criterio de BULGER (12), JAWETZ (62), a las cuatro horas de la curva de muerte en determinadas cepas. Solo la combinación gentamicina más ceftazidima, sobre la cepa 85, mostró también efectos sinérgicos a las 24 horas. Valorando la interacción a las 24 horas observamos que algunas combinaciones que fueron sinérgicas a las 4 horas, mostraron efectos antagónicos: (sisomicina más cefotaxima) (cepa 85), (gentamicina más cefotaxima) (cepa 85) y (gentamicina más ceftazidima) (cepa 25). Por otra parte a las 24 horas, se observaron efectos sinérgicos en combinaciones que no lo fueron a las 4 horas (sisomicina más ceftazidima) en las tres cepas y (gentamicina más ceftazidima) (cepa 32).

Estos resultados muestran discrepancias en el tipo de efectos según se valore con un criterio u otro en razón de la hora de hacer el estudio. Estas diferencias ya habían sido puesta de manifiesto PEREA y cols (112). Si bien no hay todavía una explicación satisfactoria de esos comportamientos, podrían suponerse debidos a posibles cambios parciales en la estructura de la molécula de algunos de los antibióticos por acción de los enzimas bacterianos, o bien a posible aparición de cepas resistentes a los antibióticos. En la práctica, sin embargo, es donde se plantean los problemas más acuciantes, ya que hay que decidir qué tiempo -las 4 ó las 24 horas- es el más adecuado para valorar la interacción. La mayoría de autores (112,148) son más partidarios de que

la valoración se haga a las 24 horas, porque no encuentran variaciones significativas a las 4 horas en las curvas de muerte, utilizando combinaciones de otros antibióticos en diferentes microorganismos.

Después de aplicar el estudio estadístico a los datos obtenidos en las curvas de muerte, extraemos algunas consideraciones, que nos parecen interesantes. La observación de que en las muestras tratadas con amicacina sola y con las combinaciones de éste aminoglicósido con cefotaxima y ceftazidima, se den los valores más bajos en el número de UFC a lo largo de las 24 horas y en las tres cepas, indica un mayor efecto bactericida que contrasta con los efectos de indiferencia y antagonismo que presentan esas combinaciones, utilizando los criterios establecidos. Esta aparente discrepancia podría explicarse en base al gran efecto bactericida ejercido por las concentraciones subinhibitorias de amicacina que no permitió una acción conjunta de los betalactámicos con los que se combinó en cada caso. De hecho, la acción bactericida ejercida por la amicacina sola, y la de sus combinaciones no mostró diferencias significativas a lo largo de las 24 horas en las cepas estudiadas. Sin embargo a las 24 horas las otras dos combinaciones -sisomicina más ceftazidima- y -gentamicina más ceftazidima-, que mostraron mayores efectos bactericidas, se comportaron como sinérgicos sobre la cepa 85. Creemos que esta doble cualidad supone un dato de interés aplicativo, que en la segunda de las combinaciones citadas viene reforzada por el hecho de presentar también efecto sinérgico a las 4 horas.

El estudio estadístico realizado a las 4 horas en la cepa 85, pone de manifiesto que los mayores efectos bactericidas corresponde a la amicacina, gentamicina, solas, y a las combinaciones de amicacina y gentamicina con los dos betalactámicos. Se muestra también aquí, según el criterio seguido por BULGER (12), efectos indiferentes las combinacio-

nes de amicacina, mientras que son sinérgicos los encontrados para las combinaciones de gentamicina.

Junto al efecto sinérgico valorables según los distintos criterios -a las 4 y a las 24 horas-, creemos que es aconsejable también tener en cuenta el efecto bactericida global de cada antibiótico y sus combinaciones, a lo largo del tiempo, y el que se puede poner de manifiesto a intervalos particulares. A título de muestra apreciamos que mientras la combinación (amicacina más cefotaxima) tiene un efecto bactericida muy reducido al finalizar la primera hora, mostrándose significativamente inferior ($p < 0,05$) a los otros citados, sin embargo a las dos horas aparece como la acción bactericida más importante y así se mantiene hasta finalizar las 24 horas. Este estudio de la interacción antibiótico-tiempo para valorar el número de UFC solo se pudo hacer en la cepa 85, única de las tres que dió valores significativos al hacer el análisis de la varianza ($p < 0,001$). Sin embargo somos conscientes del gran trabajo y tiempo que habría que utilizar para valorar el efecto bactericida que hemos señalado, puesto que implicaría hacer un estudio pormenorizado en cada una de las cientos de cepas estudiadas en cada caso.

Cuando comparamos los resultados obtenidos de los efectos de las combinaciones de antibióticos utilizando la técnica de dilución en cuadrado, en relación con los obtenidos a partir de la curva de muerte encontramos también diferencias. Hay algunas coincidencias como el efecto sinérgico de las combinaciones (sisomicina más ceftazidima) (cepa 25) y (gentamicina más ceftazidima) (cepa 85). Por otra parte coinciden igualmente los resultados obtenidos de efectos antagónicos de (sisomicina más cefotaxima) (cepa 85) y (gentamicina y cefotaxima) (cepa 85).

Las diferencias en los resultados según la técnica utilizada,

ha sido puesta de manifiesto por BAYER (7), NORDEN (104), ensayando otras combinaciones de antibióticos sobre Klebsiella pneumoniae. La explicación de esas diferencias radica en que con la técnica de dilución en cuadrado se valora la capacidad de una combinación de antibióticos de inhibir el crecimiento bacteriano y se observa el resultado final de la interacción a las 18-24 horas, mientras que con la curva de muerte se valora la proporción de muerte bacteriana determinada por la combinación y la dinámica de esta interacción en el tiempo estimándose que con cada técnica se valora un fenómeno diferente y en consecuencia no debe sorprender que en ciertos casos no se de una buena correlación. Algunos autores, GREENWOOD y col (62) considera que la técnica de dilución en cuadrado es pobre en resultados, por lo que no aconseja que sirva de pauta para indicaciones en la terapéutica antimicrobiana. Por otra parte KING (68) afirma que la técnica de dilución en cuadrado es imprecisa y errónea (25).

El efecto de concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre la morfología bacteriana había sido descrita desde hace años, utilizando Penicilina (1,27,31) aunque el significado del mismo no se ha sabido hasta más recientemente (35,69,83,84,159). Se han descrito alargamientos y engrosamientos de la pared bacteriana por efecto de algunas cefalosporinas (83,85,86) y se ha interpretado que esas formas alargadas se debían a una alteración en la síntesis de las proteínas necesarias para la división celular (SPRATT (136), para ENG (24) esas formas aberrantes a que dan lugar algunos betalactámicos -ceftazidima- se deberían a las alteraciones ocasionadas por la unión del antibiótico con un tipo de proteína fijadora de penicilina (PBP 3) pero no otras (PBP, 1 y 2).

En nuestros resultados hemos observado que las cepas trata-

das solo con betalactámicos, desde la segunda hora hasta el final, presentan abundantes esferoplastos, con las características morfológicas ya citadas (83,84,85,86). Sin embargo, utilizando las combinaciones de beta-lactámicos con aminoglicósidos, observamos bacilos con morfología típica de P.aeruginosa en las dos primeras horas. En las horas siguientes pudimos comprobar la aparición de esferoplastos. Tal vez estos resultados sean comparables a los descritos por HAYES (58) quien en cepas de P.aeruginosa, tratadas con ceftazidima observa un período transitorio en el que se forman bacilos filamentosos, aberrantes, seguidos de otra fase con una reducción del número de colonias. Esa secuencia de sucesos la asocia a la unión a las PBP tipo 3 y tipo 1, de la ceftazidima que conduce finalmente a la lisis bacteriana. Nuestros resultados, utilizando la tinción con azul de metileno, sin embargo, son diferentes porque en dos cepas observamos con ceftazidima, cefotaxima y las combinaciones de éstos con sisomicina y gentamicina, que aparecen esferoplastos en fases intermedias de la curva, pero se produce un recrecimiento bacteriano al final de las 24 horas. Este recrecimiento en las últimas fases, viene confirmado en el estudio estadístico por una relación lineal significativa entre número de UFC y tiempo. Aunque no es fácil encontrar una explicación convincente para la existencia de ese recrecimiento, LAYTE (80) interpreta que podrá deberse al resultado de la formación de agregados de células bacterianas íntimamente adheridas a la pared del tubo. En nuestro estudio estas observaciones no tuvieron lugar, pues los matraces con las muestras estuvieron en un baño de agitación durante las 24 horas del experimento.

La CMI de las cepas durante y después de su exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos solos y en combinación no mostró ningún cambio en su sensibilidad, GIALDRONI (36,37) observó el mismo efecto cuando estudiaba E.coli, P.aeruginosa y Staphylococcus aureus expuestos a concentraciones subinhibitorias de penicilina, gentami-

cina, cloranfenicol y fosfomicina, afirmando que las concentraciones subinhibitorias de antibióticos no modifican la CMI de los antibióticos ensayados y tienen escaso efecto en el crecimiento. Esto podría ser atribuido al hecho de que las concentraciones subinhibitorias eliminan solo a la parte más sensible de la población, o inducen modificaciones estructurales reversibles en el resto. Por otra parte GWYNN (52) confirma lo señalado, al observar que las bacterias que habían crecido en presencia de antibióticos betalactámicos no modifican su sensibilidad.

5.3.2. Modificaciones de la turbidez del medio de cultivo.

De nuestra valoración estadística deducimos que sólo se dan escasas relaciones lineales significativas entre grado de turbidez y log. del número de UFC (Tabla XLII). De esto deducimos, que la turbidez no es una buena técnica para valorar el grado de crecimiento bacteriano. Contra la afirmación de algunos autores (46,47,48,49,159), esta técnica no nos permite dar una orientación acerca del comportamiento que tendrá la cepa frente al antibiótico estudiado a las 4 horas, pues la medida del crecimiento con la densidad óptica es muy similar en todos los cultivos en las primeras horas. Después de este período la razón de crecimiento en presencia de concentraciones subinhibitorias de antibióticos beta-lactámicos o aminoglicósidos disminuye comparada con el control. NORDSTROM (105) también observó este efecto con otros beta-lactámicos. ZANON (159) manifiesta sus dudas sobre la validez de la turbidimetría como técnica para medir el número de bacterias, porque a concentraciones subinhibitorias las células aumentan de volumen y por ello aumenta la densidad óptica, y lo que se mide es la masa celular, más bien que el número de bacterias.

5.3.3. Modificaciones del pH.

La determinación del pH del medio de cultivo tiene interés pues puede influir sobre la actividad de los antibióticos. Algunos autores han coincidido en afirmar la presunta indiferencia del pH sobre la acción de determinados antibióticos betalactámicos. Así PEREA y col(111), afirman que variaciones en el pH del medio de cultivo de 6 á 8, no producen efecto significativo en la actividad de cefoxitina y los microorganismos no cambian su susceptibilidad o resistencia. En el mismo sentido se interpretan los resultados de NEU (106). No obstante HOU y POLE (60) señalan que los betalactámicos son varias veces más potentes en un medio ácido determinado, pH 5,5 que en un medio alcalino. De ello se puede deducir que este grupo tiene una acción óptima a pH de 5,5 á 7,5. Por eso se ha afirmado que en orina, la acción de éstos mejorará con la acidificación del medio. Por otra parte, es conocido que los aminoglicósidos son más activos en medio básico (28).

No ha sido objetivo de nuestro trabajo estudiar las modificaciones en la actividad de los antibióticos, a distintos valores de pH. Sin embargo, hemos apreciado pequeñas variaciones en el mismo a lo largo de los distintos ensayos que trataremos de comentar. Esas oscilaciones del pH a través del tiempo fueron en general inferiores a la unidad, por ello pensamos que influyeron poco en la actividad de los antibióticos. El incremento máximo fué de 0,41 cuando la cepa 25 creció en presencia de cefotaxima.

Observamos que un cambio mínimo del pH inicial, cuando la cepa 25 fué tratada con sisomicina y gentamicina, no parece coincidir con una menor actividad de ambos antibióticos. El hecho de que la amicacina, que como todos los aminoglicósidos se muestra más activo con

pH alcalino, explicaría en parte el que las tres cepas tratadas con este antibiótico presentaron valores de pH significativamente superior ($p < 0,05$) a la casi totalidad de las restantes; aunque esas diferencias no pueden servir de base para explicar la mayor actividad bactericida de este antibiótico. Los otros dos aminoglicósidos, en cuanto a la medida del pH no muestran valores superponibles, si bien las muestras de la cepa 32 tratadas con gentamicina ponen de manifiesto una relación pH-tiempo significativa ($p < 0,02$).

5.3.4. Modificaciones de los niveles de antibióticos.

La determinación de los niveles de antibióticos durante la curva de muerte la hemos realizado por cromatografía líquida de alta presión, pues el método microbiológico no es válido ya que las concentraciones subinhibitorias utilizadas son muy bajas y la técnica no es tan sensible como para poder detectarlo. Por otra parte resulta imposible encontrar cepas que permitan detectar las concentraciones de dos antibióticos en combinación, ya que se puede dar un fenómeno de sinergia entre ellos frente a la cepa patrón o la imposibilidad de encontrar cepas sensibles a uno y resistente al otro antibiótico, dadas las múltiples combinaciones que de los mismos se pueden presentar.

La cromatografía líquida de alta presión, es el único método con gran sensibilidad que nos permite detectar antibióticos en rango de microgramos (38,81,154), y especificidad, puesto que está basado en la diferente absorción según la estructura química de los mismos. Así la cuantificación para los antibióticos betalactámicos está basada en la absorción de luz ultravioleta, y la de los aminoglicósidos en la medida de fluorescencia (102,118,133). Estas propiedades nos han permitido identificar simultáneamente concentraciones de varios antibióticos, aunque tengan estructura química muy parecida. Presenta además la

ventaja de ser una técnica rápida. Después de inyectar las muestras en las columnas correspondientes, en menos de 5 minutos se obtienen los resultados (102,155).

Hasta hace poco tiempo solo se había utilizado la cromatografía líquida de alta presión para las determinaciones de cefotaxima (118) y gentamicina (3,4,89,96). En nuestro laboratorio se habían puesto a punto en el momento de la realización de nuestro trabajo las determinaciones de ceftazidima, sisomicina y amicacina.

Del estudio de regresión entre nivel de antibióticos en relación con el tiempo, observamos que aquellos antibióticos que disminuyen significativamente, en su mayor parte, corresponden a los que tienen sus efectos bactericidas en las primeras horas, como se demuestra en el estudio de regresión realizado entre nivel de antibióticos y número de UFC, y teniendo presente cómo varía este número -que equivale a efecto bactericida- a lo largo del tiempo. De todo ello se puede deducir que una vez ejercida la acción sobre la bacteria, hay una inactivación parcial de la molécula, probablemente producida por su unión o absorción a la estructura bacteriana. En este sentido interpretamos que la disminución en los niveles de antibióticos vendría motivada por su fijación a la célula del microorganismo que simultáneamente perecería. En el caso de los betalactámicos la disminución de sus niveles podría deberse a una alteración de la molécula por la temperatura, ya que son muy termolábiles, pero esto no serviría de explicación en el caso de los aminoglicósidos, muy termoestables.

No es fácil interpretar el diferente comportamiento entre unos y otros antibióticos. Tal vez algunos son más susceptibles de perder parcialmente su estructura activa. En este sentido y considerando todas las cepas, la sisomicina y el cefotaxima, cuando estuvieron combinados

fueron las que presentaron un mayor descenso a medida que pasaba el tiempo. El número elevado de relaciones lineales positivas estadísticamente significativas entre nivel de antibióticos y número de UFC, sugieren que la pérdida de nivel detectable guarda estrecha relación con los efectos bactericidas.

6. CONCLUSIONES

1. La valoración de la CMI muestra que los antibióticos más activos de todos los estudiados son la imipenema y la ceftazidima.
2. Con la técnica de dilución en cuadrado se observó que: El mayor efecto sinérgico se produjo con la combinación de amicacina más moxalactam. El mayor efecto de adición con la combinación gentamicina más imipenema. El mayor efecto antagónico con la combinación gentamicina más cefoperazona, y la interacción menos favorable fué sisomicina más cefoperazona.
3. El estudio de las interacciones entre antibióticos aminoglicósidos y betalactámicos, muestran resultados discrepantes, utilizando la técnica de dilución en cuadrado, en relación con los obtenidos en las curvas de muerte.
4. Mediante el estudio de la curva de muerte las interacciones son distintas según que el tiempo elegido para la valoración fueran las 4 ó las 24 horas. El gran número de interacciones indeterminadas a las 4 horas permite afirmar que la valoración de las interacciones mediante la curva de muerte se debe realizar a las 8 ó 24 horas.
5. El estudio realizado a las 24 horas muestra: Efecto sinérgico, de las combinaciones sisomicina más ceftazidima en todas las cepas, y de gentamicina más ceftazidima en dos terceras partes de las cepas estudiadas. Efecto antagónico de las combinaciones de sisomicina más cefotaxima en todas las cepas; de amicacina más ceftazidima en las dos terceras partes de las cepas, y de gentamicina más cefotaxima en dos terceras partes de las cepas estudiadas. Efecto indeterminado, en las combinaciones de amicacina más cefotaxima en todas las cepas; de amicacina más ceftazidima en un tercio de las cepas y de gentamicina más cefotaxima en un tercio de las cepas estudiadas.

6. El estudio estadístico de las variaciones del número de UFC valorando la interacción antibiótico-tiempo, nos parece un buen método para cuantificar los efectos bactericidas de antibióticos solos o en combinación.
7. Según este estudio la amicacina y sus combinaciones a las dosis utilizadas, muestran los mayores efectos bactericidas a lo largo de las 24 horas.
8. Las concentraciones subinhibitorias de los antibióticos utilizado no modificaron la morfología de las colonias bacterianas en su cultivo posterior a la exposición de los antibióticos. Tampoco se modificaron los valores de CMI iniciales sobre las bacterias que recrecieron tras exposición a aquellas concentraciones de antibióticos.
9. La acción de los betalactámicos determinó la aparición de esferoplastos desde la segunda hora. Los aminoglicósidos en concentraciones subinhibitorias no alteraron aparentemente la morfología microscópica de P.aeruginosa.
10. La turbidez no se muestra buena técnica para medir el grado de crecimiento bacteriano, en cuanto al número de bacterias.
11. Las modificaciones del pH del medio de cultivo fueron muy pequeñas en todas las muestras. No hay datos que permitan afirmar que influyeran en la actividad de los antibióticos.
12. La determinación de las concentraciones de antibióticos, mediante la cromatografía líquida de alta presión se muestra un procedimiento de gran valor en el estudio de los efectos bactericidas de aquellos.

13. Mediante dicha técnica se han obtenido niveles de antibióticos que muestran una relación lineal significativa positiva con el número de bacterias en la mayoría de los ensayos estudiados, sugiriendo que la disminución del nivel de antibióticos sea en buena parte debida a su fijación sobre la célula bacteriana.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, E.P.: The action of antibiotics on bacteria. En Florey, H.W. (ed). Antibiotics. Oxford University Press. pp.1438-1496. New York, - 1949.
2. ANDERSON, E.T.; YOUNG, L.S. y HEWIT, W.L.: Antimicrobial synergism in the therapy of Gram-negative rod bacteremia. Chemother (Basel), 24:45-54, 1978.
3. ANHALT, J.P.: Assay of Gentamicin in serum by High-Pressure Liquid Chromatography. Antimicrobial Agents Chemother, 11: 651-655, 1977.
4. ANHALT, J.P. y MOYER, T.P.: The role of gas-liquid chromatography in therapeutic drug monitoring. Lab. Med., 11: 797-806, 1980.
5. BARRY, A.L; THORNSBERRY, C. y JONES, R.N.: In vitro evaluation of LY127935 (60595) compared with cefotaxime, eight other beta-lactams and two aminoglycosides. J. Antimicrob. Chemother. 6:775-784, 1980.
6. BARZA, M.; TALLY, F.P.; JACOBUS, N.V. y GORBACH, S.L.: In vitro activity of Ly 127935. Antimicrob. Agents Chemother, 16:287-291, 1979.
7. BAYER, A.S. y MORRISON, J.O.: Disparity between timed-kill and checkerboard methods for determinations of in vitro bactericidal interactions of vancomycin plus rifampin versus methicillin susceptible and resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother., 20, n° 2: 220-223, 1984.
8. BEREMBAUM, M.C.: A method for testing for synergy with any number of agents. J. Infect. Dis., 137: 122-130, 1978.
9. BEREMBAUM, M.C.: Correlation between methods for measurement of

- synergy. *J. Infect. Dis.*, 142 n° 3: 476-478, 1980.
10. BOUZA, E.; HELLIN, T.; SANZ-HOSPITAL, J.; RODRIGUEZ-CREIXENIS, M; LOZA, E. y MARTINEZ-BELTRAN, J.: Evaluation of ceftazidime in the treatment of severe bacterial infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 12, -suppl. A: 153-159, 1983.
 11. BUCHANAN, R.E. y GIBBONS, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 8ª ed. 1974.
 12. BULGER, R.J. y KIRBY, W.M.: Gentamicin and ampicillin: synergism with other antibiotics. *Am. J. Med. Sci.*, 246: 717-726, 1963.
 13. CAMI, J.: Avances en la farmacología de los antibióticos beta-lactámicos. pp. 54-59. En Laporte, J. y Salvat, J.A. (eds). *Avances en Terapéutica*, 12. Ed. Universidad Autónoma de Barcelona. Salvat. Barcelona, 1982.
 14. CHANDRASEKAR, P.H.; SCHELL, R.F.; LE FROCK, J.L.; ROLSTON, K.V.I. y FRANCISCO, M.: Activity of Cefsulodin, other beta-lactams, and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemother.*, 30: 165-169, 1984.
 15. COOPER, M.D.; KEENY, R.E.; LYOUS, S.F. y CHEATHE, E.L.: Synergistic effects of ampicillin-aminoglycoside combinations on group B streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 484-486, 1979.
 16. CORRADO, M.L.; LAUDESMAN, S.H. y CHERUBIN, C.E.: Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin, and N-formimidoyl, thienamycin (MKO787) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18, n° 6: 893-896, -

1980.

17. CLUMECK, N.; GORDTS, B.; DAB, L.; JASPAR, N.; LAETHEM, V. y BUTZLER, J.P.: Ceftazidime as a single agent in the treatment of severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, -suppl. A: 207-211, 1983.
18. DASCHNER, F.D.; STEFFEUS, A.; JUST, M. y METZGER, M.: Synergismus von Netilmicin und anderen aminoglykosiden mit cefotaxim gegen nosokomiale, nicht ferenantierende erreger. *Infect.* 8 (suppl.4): 433-436, 1980.
19. DRUSANO, G.L.; STANDIFORD, H.C. y FITZPATRICK, B.: Comparison of the pharmacokinetics of ceftazidime and moxalactam and their microbiological correlates in volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, n° 3: 388-393, 1984.
20. DUGUID, J.P.: The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. *Edinburgh Med. J.*, 53: 401-412, 1946.
21. EASTON, C.J. y KNOWLES, J.R.: Correlation of the effect of beta-lactamase inhibitors on the betalactamase in growing cultures of Gram-negative bacteria with their effect on the isolated beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, n° 3: 358-363, 1984.
22. EHRLICH, P: *Experimental Researches on Specific Therapeutics*, 91-95, H.K. Lewis, London. 1908.
23. ELION, G.B.; SINGER, S. y HITCHINGS, G.H.: Antagonists of nucleic acid derivatives; VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.*, 200: 477-488, 1954.

24. ENG, R.H.K.; SMITH, S.M. y CHERUBIN, C.: Inoculum effect of new beta-lactam antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, n° 1: 42-47, 1984.
25. ERON, L.J.; PARK, C.H.; HISCON, D.L.; GOLDENBERG, R.I. y PORETZ, D.M.: Ceftazidime in patients with *Pseudomonas* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 12, suppl. A: 161-169, 1983.
26. FELDMAN, W.E. y ZWEIGHAFT, T.: Effect of ampicillin and chloramphenicol against *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 240-242, 1979.
27. FLEMING, A.; VOUREKA, A.; KRAMER, I.R.H.; HUGHES, W.H.: The morphology and motility of *Proteus vulgaris* and other organisms cultured in the presence of penicillin. *J. Gen. Microbiol.*, 4: 257-269, 1950.
28. FU, K.P. y NEU, H.C.: In vitro study of netilmicin compared with other aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10 (3): 526-534, 1976.
29. FU, K.P. y NEU, H.C.: Beta-lactamase stability of HR-756, a novel cephalosporin, compared to that of cefuroxime and cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 322-326, 1978.
30. FU, K.P. y NEU, H.C.: The comparative beta-lactamase resistance and inhibitory activity of 1-oxa-cephalosporin, cefoxitin, and cefotaxime. *J. Antibiot.*, 32: 909-914, 1979.
31. GARDNER, A.D.: Morphological effects of penicillin on bacteria. *Nature*, 146: 837-838, 1940.

32. GARDNER, P.; GRIFFIN, W.B.; SWARTZ, N.N. y KUNG, L.J.: Nonfermentative Gram-negative bacilli of nosocomial interest. *Am.J.-Med.*, 48: 735-749, 1970.
33. GARROD, L.P. y WATERWORTH, P.M.: Methods of testing combined antibiotic bactericidal action and the significance of the result. *J.Clin.Pathol.*, 15: 328-338, 1962.
34. GARROD, L.P. y WATERWORTH, P.J.: Effects of medium composition on the apparent sensitivity of *P.aeruginosa* to gentamicin. *J.Clin.Pathol.*, 22: 534-538, 1969.
35. GEMMELL, C.G.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on experimental pyogenic infections in mice: current chemotherapy. In Siegenthaler, W. and Lüthy, R. (ed). pp. 18-23. Proceedings of the International Congress of Chemotherapy. Zurich, Switzerland. Sept. American Society for Microbiology, 1977.
36. GIALDRONI GRASSI, G.: Drug-inactivating enzymes of bacteria grown in subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Rev.Infect.-Dis.*, 1. n° 5: 852-857, 1979.
37. GIALDRONI GRASSI, G.; FERRARA, A.; NAVONE, A. y SALA, P.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on the emergence of drug resistant bacteria in vitro. *J.Antimicrob. Chemother.*, 6: 217-223, 1980.
38. GIESE, R.W.: Technical considerations in the use of "high-performance" liquid chromatography in therapeutic drug monitoring. *Clin.-Chem.*, 29: 1331-1343, 1983.

39. GILBERT, D.N.; KUTSHER, E.; IRELAND, P.; BARNETT, J.A. y SANFORD, J.P.: Effect of the concentrations of magnesium and calcium on the in vitro susceptibility of *P. aeruginosa* to gentamicin. *J. Infect. Dis.*, 124: 537-545, 1971.
40. GILARDI, G.L.: *Pseudomonas* species in clinical microbiology, *Mt. Sinai. J. Med. N.Y.*, 43: 710-726, 1976.
41. GLEW, R.H. y PAVUK, R.A.: Early synergistic interactions between amikacin and some beta-lactam antibiotics against multiply resistant members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, n° 3: 378-381 1984.
42. GOBERNADO, M.; CANTON, E. y SANTOS, M.: Aztreonam: actividad in vitro. *Microbiología Española*. 36, n° 3-4: 123-132, 1983.
43. GOZZARD, D.I.; GEDDES, A.M.; FARRELL, I.D.; EKYN, S.J.; PHILLIPS, Z.; WISE, R. y BROWN, R.M.: Ceftazidime. A new extended spectrum cephalosporin. *Lancet*, 1152-6, 1982.
44. GRAEME, S.A.: *Farmacología clínica y terapéutica*. Ed. Salvat. 1983.
45. GRANINGER, W., Ho. I.; FRANCESCONI, M.; SCHIMIDBAUER, C. y EGGER, T.: Treatment of complicated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A comparison of the efficacy of ceftazidime with that of netilmicin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8, suppl.: 323-4, 1981.
46. GRASSI, G.G.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotic on the emergence of drug-resistant bacteria in vitro. *Curr. Chemother.*, 77: 1978.

47. GREENWOOD, D. y O'GRADY, F.: Comparison of the responses of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* to seven beta-lactam antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 128: 211-222, 1973.
48. GREENWOOD, D.: Differentiation of mechanism responsible for inoculum effects in the response of *Escherichia coli* to a variety of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2: 87-95, 1976.
49. GREENWOOD, D.: In defense turbidimetry. *J. Antimicrob. Chemother.*, 3: 286-287, 1977.
50. GREENWOOD, D.: Interactions between antibacterial drugs below the minimal inhibitory concentration. *Rev. Infect. Dis.*, 1, n° 5: 807-812, 1979.
51. GREENWOOD, D. y ELEY, A.: A turbidimetric study of the responses of selected strains of *Pseudomonas aeruginosa* to eight antipseudomonal beta-lactam antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 145, n° 1: 110-117, 1982.
52. GWYNN, M.N.; WEBB, L.T. y ROLINSON, G.N.: Regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria after the bactericidal action of carbenicillin and other beta-lactam antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 144, n° 3: 263-269, 1981.
53. HAHN, D.M.M.; SCHIMPF, S.C.; YOUNG, V.M.; FORTNER, C.L.; STANFORD, H. C. y WERNIK, P.H.: Amikacin and cephalotin: Empiric regimen for granulocytopenic cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 12, n° 5: 618-624, 1977.
54. HALL, W.H.; OPFER, B.J. y GERDING, D.N.: Comparative activities of the oxa- beta-lactam LY127935 cefotaxime, cefoperazone, cefamandole

- and ticarcillin against multiply resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17: 273-279, 1980.
55. HALL, M.J.; MIDDLETON, R.F. y WESTMACOTT, D.: The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J. Antimicrob. Chemother* 11: 427-433. 1983.
56. HALLANDER, H.; DORNBUSCH, K.; GEZELIUS, L.; JACOBSON, K. y KARLSSON, I.: Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: Interaction index and killing curve method. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22: 743-752, 1982.
57. HAMILTON-MILLER, J.M.T.; BRUMFITT, W. y REYNOLDS, A.V.: Cefotaxime (HR 756) a new cephalosporin with exceptional broad-spectrum activity in vitro *J. Antimicrob. Chemother.*, 4: 437-444, 1978.
58. HAYES, M.V. y ORR, D.C.: Mode of action ceftazidime: affinity for the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 12: 119-126, 1983.
59. HOOTON, T.M.; BLAIR, A.D.; TURCK, M. y COUNTS, G.N.: Synergism at clinically attainable concentrations of aminoglycoside and beta-lactam antibiotics. *Agents Chemother.*, 26, n° 4: 535-538, 1984.
60. HOU, S. y POLE, T.: Beta-lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *J. Pharm. Science*, 5: 503-527, 1971.
61. JANDA, J.M., SHEENAN, D.J. y BOTTONE, E.J.: Recovery of *P. aeruginosa*

- colonial dissociants on a protease detection medium. *J.Clin.Microbiol.*,15:178- 180, 1982.
62. JAWETZ,E.: The use of combinations of antimicrobial drugs. *Annu.-Rev.Pharmacol.*,8:151-170,1968.
63. JAWETZ,E.: Antimicrobial drugs: mechanisms and factors influencing their action, pp.3-10. In Kagan,B.M.(ed). *Antimicrobial Therapy*, 3rd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia,1980.
64. JAWETZ,E.: Penicilinas y Cefalosporinas. pp.509-517. En Bertram, G. Katzung (ed). *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Manual Moderno.- México D. F., 1984.
65. KARNEY, W.;HOLMES,K.K. y TURCK, M.: Comparison of five aminocyclitol antibiotics in vitro against enterobacteriaceae and *Pseudomonas*. *Antimicrob. Agents Chemothe.*,pp: 338-342, 1973.
66. KASTRUP,E.K. y BOYD, J.R. (eds): Drug facts and comparisons. pp: 1279-99. *Facts and Comparisons*. St.Louis. A division of J.B.Lippincott Company. Philadelphia. Toronto, 1983.
67. KING,A.; WARREN, C.; SHANNON, K. y PHILLIPS,I.: The in vitro antibacterial activity of cefotaxime compared with that of cefuroxime and cefoxitin *J. Antimicrob.Chemother.*, 6: 479-494, 1980.
68. KING,T.C.; SCHLESSINGER,D. y KROGSTAD,D.J.: The assessment of antimicrobial combinations. *Rev.Infect.Dis.*, 3: 627-633, 1981.
69. KLANIER, A.S. y PERKINS,R.L.: Surface manifestation of antibiotic-induced alterations in proteins synthesis in bacterial cels.

Antimicrob. Agents Chemother., 1: 164-170, 1972.

70. KLASTERSKY, J. y ZINNER, S.H.: Combinations of antibiotics for therapy of severe infections in cancer patients. Infect. 8 (suppl.1): 229-233, 1980.
71. KLASTERSKY, J.: Prediction and significance of synergy between antibiotics used for treatment for Gram-negative sepsis. Infect., 8(suppl.1): 45-48, 1980.
72. KLEIN, R.A. y MEYER, R.D.: Synergy studies with *Pseudomonas aeruginosa* Resistant to Gentamicin and/or carbenicillin. Chemother., 24: 283-289, 1978.
73. KLUGE, R.M.; STANDFORD, H.C.; TATEM, B.; YOUNG, V.M.; GREENE, W.H.; SCHIMPF, S.C. GALIA, F.M. y HORNICK, R.B.: Comparative activity of tobramycin, amikacin and gentamicin alone and with carbenicillin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 6: 442-6, 1974.
74. KROGSTAD, D.J. y MOELLERING, R.C.: Combinations of antibiotics, mechanism of interaction against bacteria. pp.298-341. En Lorian V.(ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1980.
75. KROPP, H.; KAHAN, J.S.; KAHAN, F.M.; SUNDELOF, J.; DARLAD, G.; BIRNBAUM, J: Thienamycin. A new beta-lactam antibiotic. II. 16th Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother., abstract.- 228, 1976.
76. KURTZ, T.O.; WINSTON, D.J.; HINDLER, J.A.; YOUNG, L.S.; HEWITT,

- W.L. y MARTIN, W.J.: Comparative in vitro activity of moxalactam, cefotaxime, cefoperazone, piperacillin and aminoglycosides against Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18: n° 4: 645-648, 1980.
77. KURTZ, T.O.; WINSTON, D.J.; BRUCKNER, D.A. y MARTIN, W.J.: Comparative in vitro synergistic of new beta-lactam antimicrobial agents and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 20: 239-243, 1981.
78. KYOKO, K. y KOIKE, N.: Cell wall alterations of Gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5: 95-97, 1974.
79. LORIAN, V. y SABATH, L.D.: Penicillin and cephalosporins: differences in morphology on *Proteus mirabilis*. *J. Infect. Dis.*, 125: 560-64, 1972.
80. LAYTE, S.; HARRIS, P. y ROLISON, G.N.: Factors affecting the apparent regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* following exposure to bactericidal concentrations of carbenicillin. *Chemother.*, 30: 26-30, 1984.
81. LECAILLON, J.B.; ROUAN, M.C.; SOUPPART, C.; FEBVRE, M. y JUGE, F.: Determination of cefsulodin, cefotiam, cephalixin, cefotaxime, desacetyl-cefotaxime, cefuroxime and cefroxadin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 228: 257-267, 1982.
82. LEONARD, J.M.; ALFORD, R.A. y MCGEE, Z.A.: Gentamicin and carbenicillin resistant *Pseudomonas* and *Serratia* infections epidemio-

- logic evaluation. Inters.Conf.Antimicrob.Agents Chemother. San Francisco, abstr.327,1974.
83. LORIAN, V. y ATKINSON, B.: Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. Am.J.Clin.Path.,64: 687-88, 1975.
84. LORIAN, V. y ATKINSON, B.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotic on cross walls of cocci. Antimicrob. Agents Chemother., 9: 1043-55, 1976.
85. LORIAN, V. y FREITAS, C.C.de: Minimal antibiotic concentrations of aminoglycosides and beta-lactam antibiotics for some Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci. J.Infect. Dis., 139: 595-603, 1979.
86. LORIAN, V.; ATKINSON, B.A. y AMARAL, L.: Effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*: the MIC/MAC ratio. Int.Symp.Boston, pp. 193-205, 1979.
87. LORIAN, V.: Determination of the MAC "Inhibition". p.349. In Lorian, V. (ed). Antibiotic in laboratory medicine. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1980.
88. LOVE, L.J.; SCHIMPFF, S.C.; SCHIFFER, C.A. y WIERNIK, P.H.: Improved prognosis for granulocytopenic patients with Gram-negative bacteremia. Am.J.Med., 68: 643-648, 1980.
89. MAITRA, S.K.; YOSHIKAWA, T.T.; STEYN, C.M.; GUZE, L.B. y SCHOTZ, M.C.: Amikacin Assay in serum by High-Performance liquid chromatography. Antimicrob. Agents Chemother., 14: 880-885, 1978.

90. MAITRA, S.K.; YOSHIKAWA, T.T; HAUSEN, J.L.; SCHOTZ, M.C. y GUZE, L.B. Quantitation of serum tobramycin concentration using high--pressure liquid chromatography. *Am.J.Clin.Pathol.*, 71: 428-432, 1979.
91. MARKOWITZ, S.M. y SIBILLA,D.J.: Comparative susceptibilities of clinical isolates of *Serratia marcescens* to newer cephalosporins, alone and in combination with various aminoglycosides. *Antimicrob.-Agents Chemother.*, 18: 651-5, 1980.
92. MARKS, M.I.; HAMMERBERG, S.; GREENSTONE,G. y SILVER,B.: Activity of newer aminoglycosides and carbenicillin alone and in combination against gentamicin-resistant *P.aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10: 399- 401, 1976.
93. MARTINDALE: *The Extra Pharmacopocia*. 28 edition, Reynolds, J.E.F. (ed). London. The Pharmaceutical Press, 1982.
94. MATSUBARA, N.; MINAMI, S.; MURAOKA, T.; SAIKAWA, I. y MITSUBOSHI, S.: In vitro activity of cefoperazone (T-1551), a new semisynthetic cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 731-735, 1979.
95. MEYER,R.D.; LEWIS,R.P.; HALTER, J. y WHITE,M: Gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in a general hospital. *Lancet*, 1: 580-583, 1976.
96. MILLER;M.A.; YOUSUF, P.S.; GRIFFIN, M.; BARTLETT, y CRANE, J.K.: In vitro activity of cefamandole, cefoxitin,cefuroxime and combination with aminoglycosides againts *Serratia marcescens*. *Microbiol. Immunol.*, 23: 955- 964, 1979.

97. MOELLERING, R.C. Jr.; WENNERSTON, C.B.G.; MEDREK, T. y WEINBERG, A. N.: Prevalence of high-level resistance to aminoglycosides in clinical isolates of enterococci. 1970: 335-340, 1971.
98. MOELLERING, R.D. Jr.: Antimicrobial synergy—an elusive concept. *J. Infect. Dis.*, 140: 639-641, 1979.
99. MOODY, J.A.; PETERSON, L.R. y GERDING, D.N.: In vitro activities of ureidopenicillins alone and in combination with amikacin and three cephalosporin antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, n°2: 256-259, 1984.
100. MURRAY, B.E.; MOELLERING, R.C. Jr.: Cephalosporins. *Ann. Rev. Med.*, 32: 559-81, 1981.
101. NAMEE, W.M.; DRUSANO, G.L.; TATEM, B.A. y STANDIFORD, H.C.: The serum bactericidal activity of latamoxed (moxalactam), cefoperazone and cefotaxime. *Antimicrob. Chemother.*, 14: 491-497, 1984.
102. NILSSON, E.: High-pressure liquid chromatography as a tool for determination of antibiotics in biological fluids. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 259 61-66, 1977.
103. NORDEN, C.W.; WENTZEL, H. y KELETI, E.: Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergism. *J. Infect. Dis.*, 140, n° 4: 629- 633, 1979.
104. NORDEN, C.W.: Problems in determination of antibiotics synergism in vitro. *Rev. Infect. Dis.*, 4: 276-281, 1982.

105. NORDSTROM, K. y SYKES, R.B.: Effects of sublethal concentrations of benzylpenicillin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol.4 741- 746, 1973.
106. NEU, H.C.: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotics: Antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by Gram-negative beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6: 170-6, 1974.
107. NEU, H.C.; ASWAPOKEE, N.; FU, K.P. y ASWAPOKEE, P.: Antimicrobial activity of a new-1-oxa-cephalosporin compared with that of other beta-lactam compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 141-9, -1979.
108. NEU, H.C. y LABTHAVIKUL, P.: Antibacterial activity and beta-lactamase stability of ceftazidime an aminothiazolyl cephalosporin potentially active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.-Agents Chemother.*, 21:11-18, 1982.
109. NEU, H.C. y LABTHAVIKUL, P.: Comparative in vitro activity of N-formimidoyl. Thienamycin against Gram-positive and Gram-negative aerobic and anaerobic species and beta-lactamase stability. *Antimicrob. Agents Chemothe.*, 21: 180-187, 1982.
110. PEDERSON, M.M.; MARSO, E. y PICKETT, M.J.: Nonfermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am. J. Clin. Pathol* 54: 178-192, 1970.
111. PEREA, E.; AZNAR, J.; GARCIA-IGLESIAS, M.C. y BOROBIO, M.V.: Cefoxitin activity against anaerobes: Effect of the inoculum size, pH variation and different culture media. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4(suppl.B): 55-60, 1973.

112. PEREA, E.J.; TORRES, M.A. y BOROBIÓ, M.V.: Synergism of fosfomicin--ampicillin and fosfomicin-chloramphenicol against salmonella and shigella. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13, n° 5: 705-709, 1978.
113. PEREA, E.J.; NOGALES, M.C.; AZNAR, J.; MARTIN, E.; IGLESIAS, M.C.: Synergy between cefotaxime, cefsulodin, azlocillin, mezlocillin and aminoglycosides against carbenicillin resistant or sensitive *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6: 471-477, 1980.
114. PEREA, E.J.; MARTIN, E.; NOGALES, A.C.; PASCUAL, A. y BOROBIÓ, M.-V.: Thienamycin activity against aerobes and anaerobes: effect of the inoculum size, pH variation and different culture medium. 12th International Congress of Chemotherapy. Abstract n° 607. Florence.- Julio 1981.
115. PEREA, E.J.; AZNAR, J.: Diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas, pag. 79-125 en: *Enfermedades infecciosas Patogenesis y diagnóstico*. Perea, E.J. ed. Salvat. Barcelona. 1983.
116. PHILLIPS, L.; KING, B.A. y SHANNON, K.P.: The mechanisms of resistance to aminoglycosides in the genus *Pseudomonas*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4: 121-129, 1978.
117. RAHAL, J.J.: Antibiotic combinations: The clinical relevance of synergy and antagonism. *Medicine (Baltimore)*, 57: 179-195, 1978.
118. REEVES, D.S.; WHITE, L.O.; HOLT, ; BAHARI, D.; BAYWATER, M.J. y BASE, R.P.: Human metabolism of Cefotaxime. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6: 93-101, 1980.
119. ROBERTS, N.J. Jr. y DOUGLAS, R.G. Jr.: Gentamicin use and *Pseudomo-*

nas and *Serratia* resistance. Effect of a surgical prophylaxis regimen. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13: 214-220, 1978.

120. ROLISON, G.N.: Subinhibitory concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 3: 111-113, 1977.
121. ROLSTON, K.V.I.; CHANDRASEKAR, P.H.; LE FROCK, J.L. y SCHELL, R.-F.: The activity of ceftazidime, other beta-lactams and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemother.*, 30: 31-34, 1984.
122. ROMAGNOLI, M.F.; FU, K.P. y NEW, H.C.: The antibacterial activity of thienamycin against multiresistant bacteria-comparison with beta-lactamase stable compounds. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6: 601-606, 1980.
123. ROSENBLATT, J.E.; O'BRIEN, H.V. y CARMALT, E.D.: High incidence of gentamicin resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Inters. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr. 163. San Francisco, 1974.
124. ROSENBLATT, J.E. y STEWART, P.R.: Combined activity of sulfamethoxazole, thimethoprim and polymixin B against Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6: 84-92, 1974.
125. RUDOLP, H.; RUDOLP, G. y GILARDI, L.: *Manual of Clinical Microbiology*. 3ª ed. Lennette, E.H.; Balow, S.A.; Hansler, W. y Truant, J.P. (eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1980.
126. RUIZ-MAYA, L.: *Métodos estadísticos de investigación*. Ed. Instituto Nacional Estadística. Presidencia del Gobierno. Madrid 1977.
127. SABATH, L.D.: Synergy of antibacterial substance by apparently

- known mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1967: 210-217, 1968.
128. SANDERS, C.C. y SANDERS, W.E. Jr.: Sisomicin a composite of comparative in vitro studies spanning 6 years. *Infection*, 4 (suppl.4): S317-323, 1976.
129. SCRIBNER, R.K.; MARKS, M.I.; WEBER, A.H.; TARPAY, M.M. y WELCH, D.F.: Activities of various beta-lactams and aminoglycosides, alone and in combination against isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 21: 939-943, 1982.
130. SHAH, P.M.; HEETDERKS, G. y STILLE, W.: Activity of amikacin at sub-inhibitory levels. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2: 97-100, 1976.
131. SHANNON, K.P.; PHILLIPS, I. y KING, B.A.: Aminoglycosides resistance Enterobacteriaceae and Acinetobacter species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4: 131-142, 1978.
132. SHEEHAN, D.J.; JANDA, M. y BOTTONE, E.J.: *Pseudomonas aeruginosa*: Changes in antibiotic susceptibility, enzymatic activity and antigenicity among colonial morphotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 15, n° 5: 926-930, 1982.
133. SIGUS, S.A.; FILE, T.M. y TAN, J.S.: High-pressure liquid chromatographic method for analysis of cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, n° 5: 625-655, 1984.
134. SKALOVA, R.; HAJSIG, D. y SMERDEL, S.: Interaction of moxalactam and gentamicin: in vitro study with strains of staphylococcus

- aureus and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 9: 100-109, 1982.
135. SOSNA, S.P.; MURRAY, P.R. y MEDOFF, G.: Comparison of the in vitro activities of HR756 with cephalotin, cefoxitin and cefamandole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 876-879, 1978.
136. SPRATT, B.G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division elongation and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc. Nat.-Acad. Sci (Wash.)*, 72:2999-3003, 1975.
137. STEERS, E.E.; FOLTZ, F.L.; GRAVES, B.S. y RIDER, J.: An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility of antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, 9:307, 1959.
138. THOMAS, F.E. Jr.; LEONARD, J.M. y ALFORD, R.H.: Sulfamethoxazole-trimethoprim-polimyxin therapy of serious multiply drug-resistant *Serratia* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9:201-207, 1976.
139. TOMASZ, A.: The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33:113-37. 1979.
140. ULLMANN, U.: Antibacterial activity of ticarcillin, tobramycin and gentamicin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Chemother.*, 23:314-323, 1977.
141. VERBIST, L. y VERHAEGEN, I.: In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin in comparison with cefotaxime, moxalactam and ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19: 402-6, 1981.
142. WAITZ, J.A.; MOSS, E.L. Jr.; ODEN, E.M. y WEINSTEIN, M.J: Biological

- studies with antibiotic 6640, a new broad spectrum aminoglycoside antibiotic., *J. Antibiotic*, 23: 559-565, 1970.
143. WAITZ, J.A.; MOSS, E.L.J.; DRUBE, C.G. y WEINSTEIN, M.Jr.: Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2: 431-7, 1972.
144. WAITZ, J.A. y MILLER, G.H.: Evaluation of the in vitro and in vivo potency of sisomicin. *Roc. Soc. Med. Int. Congr. Symp. Ser. 35*: 1-15, 1980.
145. WASHINGTON, II. A.I.: The effects and significance of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Rev. Infect. Dis.*, 1, n° 5: 781-786, 1979.
146. WASHINGTON, II. J.R. y BARRY, A.L.: Dilution susceptibility test: Agar and macro-broth dilution. *Procedures*. pp. 453-458. En Lennette, E.H.; Spaulding E.H. y Truant, J.P. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington D.C., 1980.
147. WINER, B.J.: *Statistical principles in experimental design*. 2ª ed. McGraw Hill Book Company. New York, 1971.
148. WISE, R.; ROLLASON, T.; LOGAM, M.; ANDREWS, J.M. y BEDFORD, K.A.: HR756, a highly active cephalosporin: Comparison with cefazolin and carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 807-11, 1978.
149. WISE, R.; ANDREWS, J.M.; BEDFORD, K.A.: LY127935, a novel oxa-beta-lactam: An in vitro comparison with other beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 341-345, 1979.

150. WISE, R.; GILLET, A.P.; ANDREWS, J.M. y BEDFORD, K.A.: Ro139904: A cephalosporin with a high degree of activity and broad antibacterial activity: and in vitro comparative study. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6:595-600, 1980.
151. WEAVER, S.S.; BODEY, G.P. y LA BLANC, B.M.: Thienamycin: New beta-lactam antibiotic with potent broad-spectrum activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 528-21, 1979.
152. WEINSTEIN, R.J.; YOUNG, L.S. y HEWITT, W.L.: Comparison of methods for assessing in vitro antibiotic synergism against *Pseudomonas* and *Serratia*. *J. Lab. Clin. Med.*, 86: 853-862, 1975.
153. WOLD, J.S. y TURNIPSEED, S.A.: Determination of cephaloridine in serum and tissue by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 136: 170-173, 1977.
154. WOLD, J.S.: Rapid analysis of cefazolin in serum by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11:105-109, 1977.
155. YOSHIKAWA, T.; MAITRA, S.K.; SCHOTZ, M.C. y GUZE, L.B.: High-pressure liquid chromatography for quantitation of antimicrobial agents. *Rev. Infect. Dis.*, 2: 169-181, 1980.
156. YOUNG, L.S.: Review of clinical significance of synergy in Gram-negative infections at the University of California. Los Angeles Hospital. *Infect.*, 6 (suppl.1):47-51, 1978.
157. YOUNG, L.S.; MEYER-DUDNIK, D.V.; HINDLER, J. y MARTIN, W.J.: Aminoglycosides in the treatment of bacteraemic infections in the

- immunocompromised host. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8 (suppl.A): 121--132, 1981.
158. YU, V.L.; VICKERS, R.M. y ZURAVLEFF, J.J.: Comparative susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* to 1-oxacephalosporin (LY127935) and eight other antipseudomonal antimicrobial agents (old and new). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17: 96-98, 1980.
159. ZANON, U.: Sub-inhibitory levels of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 3: 106-107, 1977.
160. ZIERDT, C.H. y SCHMIDT, P.J.: Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 87: 1003-1010, 1964.
161. ZIMELIS, V.M. y JACKSON, G.G.: Activity of aminoglycoside antibiotics against *P. aeruginosa*: Specificity and site of calcium and magnesium antagonism. *J. Infect. Dis.*, 127: 663-669, 1973.