

CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE AMPICILINA, GENTAMICINA Y AMIKACINA SOBRE CEPAS GRAM NEGATIVAS DE ORIGEN ANIMAL

Lázaro Zurich Z. (MV), María T. Calderón G. (MV), Rodrigo Fernández C. (MV)

MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS OF SOME ANTIBIOTICS AGAINST GRAM NEGATIVE STRAINS OF ANIMAL ORIGIN

The minimal inhibitory concentrations (MIC) of ampicillin, gentamicin and amikacin and the association ampicillin-gentamicin were studied on gram negative bacterial strains collected from localized infections in bovine, canine, feline, equine and porcine species. MIC determinations were done by the agar dilution method. Results showed inhibitory effects of ampicillin, 2 to 8 µg/ml against Escherichia coli (10/16) and Proteus sp (13/17).

Ampicillin MIC for Klebsiella pneumoniae strains were greater or equal to 16 µg/ml and for Pseudomonas aeruginosa greater than 128 µg/ml. The gentamicin MIC ranged from 0.5 to 16.0 µg/ml for all the studied strains, except for 2 Escherichia coli strains which were inhibited with 128 µg/ml. The amikacin results were similar to those of gentamicin. The effects of ampicillin-gentamicin association against strains were synergical in 13 of 30 cases, additive in 16 and antagonic in one case. Results are discussed in relation to the antibiotics intrinsic activity and the possibility to reproduce the obtained MIC in vivo according the posological information in different species.

En un trabajo anterior, se comunicaron los valores de CMI de diversos antibióticos sobre cepas presentes en infecciones del conducto auditivo externo de caninos (Calderón y col., 1987). La importancia de conocer estos parámetros está relacionada con los estudios cinéticos de antimicrobianos que tienen por fin un mejor ajuste posológico que permita mejores expectativas de eficacia y menores riesgos de resistencia bacteriana (Devriese y Dutta, 1981).

En el presente trabajo se estudian las CMI *in vitro* de antibióticos de uso frecuente y reciente en veterinaria como son amikacina, gentamicina y ampicilina solos y la asociación ampicilina-gentamicina sobre cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp* y *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas de procesos sépticos de variadas localizaciones en distintas especies animales en un inten-

to por caracterizar los efectos antimicrobianos y establecer la posibilidad de reproducir *in vivo* las CMI de acuerdo a la información sobre la posología de los antibióticos estudiados (Baggot, 1983; Pedersoli, 1983; Hirsch y Ruhel, 1984).

MATERIAL Y METODOS

El trabajo fue realizado con 67 cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp* y *Pseudomonas aeruginosa* cuyo origen y distribución se presentan en el cuadro 1.

El aislamiento de las cepas se realizó mediante técnicas bacteriológicas clásicas y su identificación mediante el Manual Bergey's (1975). Las cepas controles fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Cada cepa fue sembrada en caldo Mueller Hinton (DIFCO) y los inóculos, en dilución 1:20, fueron preparados a partir de suspensiones microbianas. Las diluciones de los antibióticos fueron mezcladas con agar Mueller Hinton (Washington y Sutter, 1980) y ensayados frente a las cepas en concentraciones crecientes desde 0,25 hasta 128,0 µg/ml; la asociación ampicilina-gentamicina se estudió mediante el "tablero de ajedrez" (Sabath, 1968; Krogstad y Moellering, 1980). La inoculación de las placas se realizó me-

Laboratorios de Farmacología y Microbiología.
Departamentos de Ciencias Clínicas y Medicina Preventiva Animal.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

Trabajo financiado por Proyecto A 2422-87. DTI. Universidad de Chile.

CUADRO 1
ORIGEN Y DISTRIBUCION DE LAS CEPAS ANTIMICROBIANAS

Especies	Origen de la muestra	Kn.	Ec.	Psp	Ps.	Nº
Canina	Otitis	1	2	12	14	29
	Metritis		2		3	5
	Piodermatitis	1	1	1	3	6
	Heridas quirúrgicas		1		1	2
	Balanopostitis		1			1
Equina	Cervicitis	1	5	2	1	9
	Cistitis	3	2	1		6
	Balanopostitis	1				1
Bovina	Mastitis		2	1	1	4
Felina	Amigdalitis				1	1
	Cistitis		1			1
Porcina	Rinitis				1	1
	Metritis	1				1
Total		8	17	17	25	67

*Kn = *Klebsiella pneumoniae*; Ec = *Escherichia coli*; Psp = *Proteus sp*
Ps = *Pseudomona aeruginosa*

diente el aparato inóculo-replicador de Steer (1959).

Las CMI se expresaron en valores absolutos; las de la asociación mediante el índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF) cuya fórmula y aplicación a los resultados han sido extensamente descritos en un trabajo anterior (Calderón y cols., 1987).

Los antibióticos*, en forma de droga pura, presentaron las siguientes potencias en µg/ml: ampicilina sódica 909, 90; amikacina sulfato 610, 29 y gentamicina sulfato 619, 80.

*Laboratorio Chile S.A.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de CMI de los antibióticos por separado frente a las cuatro cepas ensayadas se muestran en los cuadros 2 y 3.

Los resultados de cada cepa permiten apreciar, en primer lugar, que *Escherichia coli* presentó mayor sensibilidad a gentamicina y amikacina con valores de CMI que es posible reproducir *in vivo* cuando las localizaciones bacterianas permiten el acceso del antibiótico, como ocurre en las infecciones genitourinarias de todas las especies dada la alta concentración de los aminoglicósidos en orina (Conzelman, 1980; Robinson, 1987). Dosis usuales, entre 2 a 5 mg/kg vía intramuscular, determinan concentraciones superiores a las obtenidas *in vitro*.

CUADRO 2
CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE AMPICILINA,
GENTAMICINA Y AMIKACINA (µg/ml)

Cepas	Nº	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	µg/ml	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	25											25		Ampicilina
<i>Escherichia coli</i>	16				1	3	6					6		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10							1		3	3	3		
<i>Proteus sp</i>	17				9	3	1			1		3		
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	25				1	1	21	2						Gentamicina
<i>Escherichia coli</i>	16		2	8	3	1					2			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8		4	4										
<i>Proteus sp</i>	17			7	8	2								
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	25			1		6	17	1						Amikacina
<i>Escherichia coli</i>	16				13	3								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8		1	3	2	2								
<i>Proteus sp</i>	17			3	7	6	1							

CUADRO 3
RESUMEN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE AMPICILINA,
GENTAMICINA Y AMIKACINA

Cepas	Nº	Antibióticos	Rangos CMI µg/ml	CMI más frecuente µg/ml (c/u)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	25	Ampicilina	- 128	128 (100)
		Gentamicina	2 - 16	8 (84)
		Amikacina	1 - 16	8 (68)
<i>Escherichia coli</i>	16	Ampicilina	2 - 128	8 (37,5) 128 (37,5)
		Gentamicina	0,5 - 128	1 (50,0)
		Amikacina	2 - 4	2 (81,3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	Ampicilina	16 - 128	64 (37,5) 128 (37,5)
		Gentamicina	0,5 - 1	0,5 (50) 1 (50)
		Amikacina	0,5 - 4	1 (37,5)
<i>Proteus sp</i>	17	Ampicilina	2 - 128	2 (52,9)
		Gentamicina	1 - 4	2 (47)
		Amikacina	1 - 8	2 (41,2)

En las infecciones tegumentarias, la aplicación tópica de aminoglicósidos también alcanza concentraciones superiores a 1 y 2 µg/ml que fueron las más frecuentes en este trabajo (Zurich, 1983). La ampicilina muestra CMI promedio de 8 µg/ml que sólo pueden ser alcanzadas con la dosis usual de 5 a 10 mg/kg (Brander y col., 1982) en orina, constituyendo una ventaja sobre los aminoglicósidos por su amplio margen de seguridad (Sande y Mandell, 1982). En todo caso parece necesario, en relación a *Escherichia coli* precisar, en trabajos futuros, los distintos serotipos como asimismo realizar estudios de concentraciones urinarias con diferentes dosis del antibiótico.

Las CMI de los antibióticos en presencia de *Klebsiella pneumoniae* mostró una tendencia muy similar a la descrita para *Escherichia coli* pero la susceptibilidad frente a amikacina y gentamicina es claramente superior a ampicilina y con CMI bajas que suponen una fácil reproducción en el animal. La CMI de 1 µg/ml para ambos aminoglicósidos fue la más frecuente en relación a 64 µg/ml de ampicilina (cuadro 3).

Respecto de *Proteus sp*, fue notable la elevada susceptibilidad de las cepas frente a los tres antibióticos como se aprecia en los cuadros 2 y 3 y cuyas bajas CMI, con promedio de 2 µg/ml son, aparentemente, fáciles de reproducir *in vivo* con las dosis terapéuticas. Sin embargo, si se observa el origen de las cepas se advierte que éstas proceden, en su mayoría, de infecciones del conducto auditivo externo de caninos, región que no es fácil de alcanzar por la vía sistémica (Calderón y col., 1987) por lo

cual, estos antibióticos son aplicados por vía tópica para asegurar CMI elevadas en la zona. A pesar que las cepas de *Proteus sp* estudiadas en el presente trabajo fueron identificadas con precisión, los resultados parecen minimizar, por ahora, este aspecto.

Las cepas de *Pseudomona* presentaron valores de CMI elevados para ampicilina y menores para los aminoglicósidos, especialmente para amikacina según se aprecia en los cuadros 2 y 3. Si bien se observa sensibilidad de las cepas frente a gentamicina, ésta se sitúa con valores de CMI promedio de 8 µg/ml cuya reproducción en el plasma de animales corresponde al límite máximo del margen de seguridad (Zurich, 1983). La mayor actividad de amikacina confirma el uso de este aminoglicósido en las infecciones por *Pseudomona aeruginosa* resistente a gentamicina (Sande y Mandel, 1982).

El estudio de la asociación ampicilina-gentamicina fue realizado con las cepas que presentaron para ampicilina una CMI menor o igual a 128 µg/ml. En el cuadro 4, se muestran los resultados de esta combinación y que, previa la obtención de los índices CIF (Calderón y col., 1987), demostró predominancia de efectos aditivos sobre *Escherichia coli*, sinérgicos sobre *Proteus sp* y variables sobre *Klebsiella pneumoniae*, dado que en este caso hubo efectos aditivos, sinérgicos y aun antagónicos. Esto último difícil de explicar con nuestros experimentos.

El estudio de la asociación presenta aspectos interesantes en el sentido de obtención de acciones sinérgicas que conducen a mayor potencia, pero la

CUADRO 4
DISTRIBUCION DE LOS EFECTOS *IN VITRO*
OBSERVADOS CON LA ASOCIACION
AMPICILINA-GENTAMICINA

Cepas	Nº	Efectos		
		Aditivos	sinérgicos	Antagónicos
<i>Escherichia coli</i>	10	9	1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	3	2	1
<i>Proteus sp.</i>	14	4	10	

aditividad es importante cuando es necesario disminuir el riesgo tóxico de un antibiótico que debe ser incluido en el esquema terapéutico como es el caso de los aminoglicósidos (Stowe, 1984).

Los resultados permiten concluir en la necesidad de estudios sistemáticos de CMI de antibióticos frente a diferentes cepas presentes en procesos infecciosos con el fin de caracterizar, de un modo cuantitativo, la eficacia y eventual resistencia en el tiempo de las cepas bacterianas y contribuir así a la mejor orientación en la selección de antimicrobianos en la clínica veterinaria.

RESUMEN

Se estudian las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de ampicilina, gentamicina, amikacina y de la asociación ampicilina-gentamicina sobre cepas bacterianas Gram negativas, obtenidas de procesos infecciosos de diversas localizaciones en especies bovina, canina, equina, felina y porcina. Las determinaciones de las CMI se realizaron mediante el método de dilución en agar.

Los resultados muestran efectos inhibitorios de ampicilina sobre cepas de *Escherichia coli* (10/16) y de *Proteus sp* (13/17) en rangos de 2 a 8 µg/ml. Las CMI de ampicilina para las cepas de *Klebsiella pneumoniae* fueron iguales o mayores de 16 µg/ml y para *Pseudomona aeruginosa* superiores a 128 µg/ml. Las CMI de gentamicina variaron entre 0,5 y 16 µg/ml para todas las cepas a excepción de dos cepas de *Escherichia coli* que fueron inhibidas con CMI de 128 µg/ml. En el caso de amikacina, los resultados fueron similares a gentamicina, pero las CMI fueron inferiores. Los efectos de la asociación ampicilina-gentamicina sobre cepas de menor susceptibilidad frente a estos antibióticos fueron de carácter sinérgico en 13 de 30 casos, aditivo en 16 y antagónico en 1. Los resultados se discuten en relación a la actividad intrínseca de los antibióticos y de la posibilidad de reproducción teórica *in vivo* de acuerdo a la información posológica en diferentes especies.

REFERENCIAS

- BAGGOT, J.D. Systemic antimicrobial therapy in large animals. En: Bogan, J.A.; Lees, P. and Yoxal, A.T. Pharmacological basis of large animal medicine. Blackwell Sc. Pub. Oxford, 1983, pp. 45-69.
- BERGEY, H.D. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th Ed. William, Wilkins, Baltimore, 1975.
- BRANDER, G.C.; D.M. PUGH, R.J. BAYWATER. Veterinary applied pharmacology and therapeutics. Bailliere-Tindall, London, 1982.
- CALDERÓN, M.T.; L. ZURICH, S. ROSENDE, L. BOSSHARD. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de algunos antibióticos sobre cepas bacterianas obtenidas de otitis canina. Av. Cs. Vet., 2, 51-56, 1987.
- CONZELMAN, M.G. Pharmacotherapeutics of aminoglycosides antibiotics. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176, 1078-1080, 1980.
- DEVRIESSE, L.A.; A.G.N. DUTTA. Antibiotic sensitivity testing: Correlations between in vitro and in vivo situation. Ann. Rech. Vet. 12, 41-46, 1981.
- HIRSCH, D.C.; W.W. RUEHL. A rational approach to the selections of an antimicrobial agent. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 1058-1061, 1984.
- KROGSTAD, D.J.; J.R.C. MOELLERING. Combinations of antibiotics, mechanisms of interaction against bacteria. En: Antibiotics in Laboratory Medicine. Ed. Lorian V., 5th Ed. Baltimore, William-Wilkins, 1980.
- PEDERSOLI, W. Antibiotics. En Robinson, N.E. Current Therapy in Equine Medicine, Phil., W. Saunders Co., 1983, pp. 43-57.
- ROBINSON, N.E. Current Therapy in Equine Medicine. 2nd Ed. Phil., W. Saunders Co., 1987.
- SABATH, L.D. Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. Antimicrob. Agents Chemother. 6: 210-217, 1968.
- SANDE, M.A.; G.L. MANDEL. Agentes antimicrobianos: Consideraciones generales. En: Bases Farmacológicas de la Terapéutica. A. Goodman y A. Gilman. 6^a Ed. Interamericana, México, 1982.
- STEERS, E. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. 9: 307-311, 1959.
- STOWE, C.M. Antimicrobial drug interaction. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 1137-1141, 1984.
- WASHINGTON II, J.A.; V.L. SUTTER. Dilution susceptibility test: Agar and macrobrith dilution procedures. En: Lennett y cols. Manual of Clinical Microbiology, 3rd Ed. Washington, D.C., Am. Soc. for Microbiol. 1980, pp. 453-458.
- ZURICH, L. Antibióticos aminoglicósidos. Aspectos farmacológicos y terapéuticos de interés en clínica veterinaria. Monografías Med. Vet. 5: 5-28, 1983.

Recibido en mayo de 1988, aprobado en septiembre de 1988.