

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DEL BACILO DE KOCH IN VITRO A LOS ANTIBIOTICOS EN USO

Por el Dr. HERNAN GARCES S.

Hospital Luis Calvo Mackenna

Desde que nuevas drogas han resultado activos bacteriostáticos del B. de Koch, ha surgido el interés de valorizar y comparar los efectos de ellas aisladamente o en combinaciones entre sí. Naturalmente dichas comparaciones sólo podrán hacerse si se permite a los antibióticos actuar en condiciones homólogas. Es sabido que influye en cierto grado las variedades de cepas del bacilo que a menudo ofrecen desigual sensibilidad o resistencia frente a los antibióticos de uso clínico. Más aún, la sensibilidad de una misma cepa puede modificarse grandemente hasta llegar a ser refractaria a uno u otro compuesto antituberculoso.

En otras investigaciones que se han hecho para establecer las sensibilidades del B. de Koch in vitro a las drogas antituberculosas han constatado que si bien las sensibilidades máximas llegarían aproximadamente a los valores siguientes: estreptomina de 0,3 a 0,7 gamas por cc. de medio; PAS de 0,7 a 1,5 gamas (6) y HAIN de 0,02 a 0,125 gamas (3-8), en tanto que si se trata de cepas de bacilos han creado resistencia espontánea o experimentalmente, aquellos límites de sensibilidad en los cultivos desciende más de 1.000 veces para la estreptomina y sobre 200 veces para la HAIN (3). Esas mismas cepas susceptibles de crear resistencia a las drogas mencionadas, no producen este fenómeno si se hace actuar sobre ellas simultáneamente combinaciones de 2 o más antibióticos. En estos casos el bacilo mantiene su sensibilidad incluso para cada una de las drogas aisladamente. En los mismos estudios se ha visto que la resistencia producida para una droga no afecta la sensibilidad para otra ni tampoco a las combinaciones de ellas, incluyendo a la propia droga en resistencia. Esta modalidad especial que toman al actuar en combinación 2 o más drogas de acción diferente ha sido estudiada, llegando a establecerse que para la asociación con la

HAIN, el efecto producido no es de potenciación, sino simplemente de complementación de acciones antituberculosas. En tanto ya es sabido por los trabajos de González y Quintanilla (5) que la estreptomina asociada con PAS produciría una clara potenciación en la inhibición del desarrollo in vitro, como se deduciría de que las concentraciones útiles en esta combinación son marcadamente bajas si se comparan con las concentraciones que requieren como límite de sensibilidad para las 2 drogas por separado.

Material de estudio. Se utilizó en estas pruebas cepas frescas de bacilos de Koch obtenidos directamente de cultivos puros en medio de Petraghani, macerando las colonias en suero fisiológico y quedando a una concentración próxima a 250 millones por cc. de la solución.

Los cultivos de estudio se efectuaron en el mismo medio sólido de Petraghani, concentrado y ampolletado en ampollas de 20 cc. y en cuya fase líquida, antes de coagular, se agregaron los diferentes antibióticos a concentraciones escalonadas. Las ampollas, una vez sembradas, se dejan con el extremo aguzado encorvado y abierto, lo cual favorece el cultivo, ya que permite suficiente aireación, a la vez que evita su desecación. Por otra parte, en esta forma rara vez se produce infección secundaria del cultivo con hongos u otros. En estas condiciones se pueden conservar los cultivos por largo tiempo.

Para cada siembra se dejó escurrir sobre el medio, 1 cc. de la suspensión de B. de Koch descrita. La adición de antibióticos al medio se hizo en diluciones sucesivamente decrecientes y asegurando una buena mezcla en todas sus partes. En cada cepa se dispuso de dos ampollas controles sin antibióticos.

La temperatura de cultivo fué de 37,5° C. El desarrollo se constató por la aparición de

colonias macroscópicas y fácilmente identificables.

Las concentraciones de antibióticos usados se detallan en cuadro aparte.

Resultados. Los cultivos se fueron revisando periódicamente, quincenalmente en los primeros 2 meses y después mensualmente. Los resultados pueden encontrarse en los cuadros N.ºs 1 y 2. En el cuadro N.º 1 se puede apreciar la sensibilidad de 4 cepas de B. de Koch cultivadas con antibióticos separadamente y con combinaciones de éstos. En este caso se completaron 45 días de observación, considerando que los controles

respectivos tenían ya un intenso desarrollo a los 12 días. Las concentraciones de antibióticos que se usaron in vitro estuvieron siempre por encima de los límites dados corrientemente para la sensibilidad del B. de Koch humano.

En el cuadro N.º 2 se muestra el comportamiento de los cultivos de Koch en función del tiempo expuestos a las diluciones de antibióticos, que se registraron suficientes para inhibir el desarrollo en la prueba anterior.

Los cultivos en estas condiciones fueron observados por un largo tiempo (5 me-

Cuadro N.º 1

	HAIN				ESTREPT.				HAIN ESTREPT.				HAIN PAS				ESTREPT. PAS				HAIN ESTREPT. PAS			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
	I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	+	-	-	++	+++	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTA.—Las diluciones de HAIN y ESTREPT. (a-b-c-d) corresponden a 500-100-10-5 gamas por c. c. del medio. Las adiciones de PAS fueron respectivamente de 10-5-t-0,5 miligramos por c. c. del medio.

Cuadro N.º 2

Días inoc. Cepas	15				30				45				60				75				90				120							
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV				
HAIN	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-
ESTREPT.	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-
HAIN ESTREPT.	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-
HAIN PAS	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-
ESTREPT. PAS	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-
HAIN ESTREPT. PAS	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-
CONTROL I	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+
CONTROL II	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+	a	+	+	+

NOTA.—Las diluciones (a-b) se usaron en combinación con HAIN y ESTREPT. respectivamente 10-5 gamas respectivamente por c. c. de medio. Las adiciones de PAS correspondieron respectivamente a 10-5 miligramos respectivamente por c. c. de medio.

ses) y se puede apreciar en el cuadro N^o 2 escalonadamente durante este período los efectos de la antibiosis en las 4 cepas de *B. de Koch* expuestas a las drogas aisladas y asociadas entre sí. La intensidad del desarrollo en cada caso se expresa en relación con el desarrollo alcanzado en las ampollas controles. Según este criterio se anota desde una +, que expresa un desarrollo escaso, pero claramente evidenciable, hasta +++, que indica el mayor desarrollo y comparativamente igual al del cultivo control.

En algunos cultivos mayores de 3 meses pudo observarse una regresión e incluso desaparición de colonias aparecidas en un comienzo, hecho al parecer por efecto del tiempo de cultivo prolongado. En dichos casos correspondía generalmente a colonias pequeñas y vidriosas. La tinción de Ziehl revelaba que se trataba de verdaderas colonias de Koch.

Comentario. Aunque el material de trabajo fué escaso, pueden tomarse los anteriores resultados como información preliminar, que puede orientar acerca del comportamiento *in vitro* del bacilo de Koch humano obtenido de cultivos corrientes frente a las drogas de uso clínico.

Llama la atención primeramente la desigual sensibilidad de las cepas de bacilo de Koch y que oscila dentro de un límite amplio. Causa de esta desigualdad es la diversa virulencia que por naturaleza, o también, como factor muy importante, por la resistencia que se crea a menudo en el bacilo de Koch expuesto a la acción parcial de uno u otro antibiótico.

Otro aspecto de esta observación es el límite de tiempo en que es activa una dosis dada de antibiótico y la disminución relativa de su acción en los cultivos prolongados, más manifiesta en las cepas resistentes.

Por las razones antes dichas, no es posible hablar de límites o cifras absolutas de sensibilidad del bacilo para cada droga, pero bien se puede apreciar su comportamiento comparativamente en las condiciones uniformes, en que se hace actuar *in vitro*. Dos de las cepas que aparecen en este estudio presentan inhibición de su desarrollo con concentraciones de drogas más altas que las corrientemente aceptadas tanto para HAIN como para estreptomycin. Sobre estas cepas que se muestran relativamente resistentes se aprecia una mayor intensidad en

la acción de las combinaciones de drogas, incluyendo la asociación del PAS. Con respecto a esta última pareció ser más evidente la acción cuando se agrega a la estreptomycin que cuando se combinó con HAIN.

Cuando los cultivos se prolongaron por un tiempo largo, la acción antibiótica fué siempre mayor dentro del primer mes, ya que a través de un tiempo más largo de cultivo se vieron aparecer algunas colonias, aunque a menudo atípicas. Cabe hacer notar que para el caso de cultivos con estreptomycin sola, la acción de ésta se vió decrecer a partir del mes, lo que permitió un amplio desarrollo del bacilo en los meses sucesivos. Esto último podría estar de acuerdo con la observación de Kirchheimer (1), para el caso de bacilos estreptomycin resistentes, en que las concentraciones altas de estreptomycin hacen descender el índice aritmético del desarrollo, pero sin influencia en la fase logarítmica del mismo. El descenso de la acción antibiótica a través del tiempo fué más rápido en las cepas que se mostraron en general más resistentes.

Resumen

Se presenta la acción antibiótica *in vitro* de las drogas antituberculosas de uso clínico frente a cepas de *B. de Koch* obtenidas de cultivos frescos. Se encuentran diferencias en el comportamiento de las distintas cepas en relación con la virulencia del germen, que condiciona una amplia variación en los límites de sensibilidad a las drogas. Es posible apreciar la acción de asociaciones de drogas, cuyo efecto es evidente en las formas más virulentas del bacilo. Es posible observar un agotamiento del antibiótico después de un cierto tiempo de cultivo, en relación, también, muy manifiesta, con la virulencia de la cepa inhibida. La acción antibiótica parece más prolongada en algunas asociaciones de drogas.

Summary

The *in vitro* action of antituberculous drugs of common clinical use on various strains of Koch's bacillus is studied. A wide margin of sensitivity to the drugs is encountered in the different strains in relation to the virulence. It was possible to demonstrate potentialization when associations of drugs were employed notably on the most viru-

lent forms. After a certain time has elapsed, it was possible to demonstrate a diminishing effectiveness of the antibiotic also in relation to the virulence of the strain. The antibiotic action appears to be prolonged with certain drug associations.

BIBLIOGRAFIA

1. FINKELSTEIN, W. F. y JOUMANS, G. P.—The Am. Rev. of Tuberc. 66: 486, 1952.
2. ELMENDORF, D y col.—The Am. Rev. of Tuberc. 65: 429, 1952.
3. Division of Research Grants & Fellowships, Public Health Service. The Am. Rev. of Tuberc. 65: 754, 1952.
4. ROBITZER, E. H. y col.—The Quarterly Bull. of Sea View Hosp. XIII: I, 1952.
5. GONZALEZ, F., QUINTANILLA, J.—Bol. Soc. Biol. 6: IV, 1949.
6. QUINTANILLA Z., J.—Tesis Licenc. 1948.
7. RUBIN, S. y col.—Deas of Chest 21: 439, 1952.
8. CATTANEO, C. y MORELLINI, M.—Min. Med. 1081: 42, 1952.