

SECCIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ORIGINALES

Susceptibilidad a netilmicina en 400 cepas bacterianas aisladas de infecciones oculares

QFB Virginia Vanzzini de R, QFB Marino Alcantara-Castro, QFB Víctor Flores

RESUMEN

Objetivo: Estudiar la susceptibilidad *in vitro* a netilmicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina y gatifloxacina de 400 cepas bacterianas recuperadas de infecciones oculares y comparar las susceptibilidades en forma estadística.

Material y métodos: Es un estudio prospectivo, comparativo y longitudinal. Se practicaron pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby-Bauer a 400 cepas de bacterias Gram positivas y negativas recuperadas de diversas muestras de infecciones bacterianas oculares; 171 muestras de queratitis, 148 de conjuntivitis, 27 de endoftalmitis, y 54 de infecciones oculares diversas.

Resultados: Se obtuvieron 254 cepas de bacterias Gram positivas y 146 cepas de bacterias Gram negativas de los siguientes géneros: 81 *Staphylococcus epidermidis*, 76 *Staphylococcus aureus*, 57 *Streptococcus*, 25 *Bacillus*, 16 *Corynebacterium* y *Actinomyces*, 58 *Enterobacteriaceae*, 50 *Pseudomonas*, 17 *Haemophilus influenzae* y 5 *Neisseria*.

El estudio estadístico se representó en gráficas para cada género de bacterias Gram positivas y negativas para los 8 antibióticos.

Conclusiones: La susceptibilidad de *Staphylococcus* coagulasa negativos a netilmicina fue mayor que la de gatifloxacina y moxifloxacina, igual que gatifloxacina para bacterias Gram negativas y mejor que tobramicina para ambos grupos de bacterias estudiadas.

Palabras clave: Aminoglucósidos, quinolonas, susceptibilidad.

SUMMARY

Objective: To know the *in vitro* susceptibility to netilmicin, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, ofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin in 400 strains isolated from ocular infections in a statistical comparative study.

Material and methods: In a retrospective, comparative and lineal study we made susceptibility test by Kirby and Bauer diffusion technique to 400 Gram positive and Gram negative ocular bacterial isolates, the ocular sources were 171 bacterial keratitis, 148 conjunctivitis, 27 endophthalmitis, and 54 other ocular infections.

Results: The bacterial isolates were 254 Gram positive and 146 Gram negative bacterial strains, 81 *Staphylococcus epidermidis*, 76 *Staphylococcus aureus*, 57 *Streptococcus*, 25 *Bacillus*, 16 *Corynebacterium* and *Actinomyces*, 58 *Enterobacteriaceae*, 50 *Pseudomonas*, 17 *Haemophilus influenzae* and 5 *Neisseria*. Statistic study by logistic regression method was applied.

Conclusions: The susceptibility to netilmicin of *Staphylococcus* coagulase negative was higher than gatifloxacin and moxifloxacin, equal to gatifloxacin for Gram negative and positive bacteria and better than tobramycin in both major bacterial group studied.

Key words: Aminoglycoside, quinolones, susceptibility.

INTRODUCCIÓN

Los aminoglucósidos, antibióticos aparecidos en la década de 1940, aumentaron de forma importante el arsenal de antibacterianos disponibles en la actualidad. Son bactericidas, su actividad puede ser sinérgica con las penicilinas o las cefalosporinas. El primer antibiótico de este grupo

fue obtenido de *Streptomyces spp*, y los que se han derivado de este hongo tienen en la denominación el sufijo mycina en idioma inglés y los derivados de *Micromonospora* la terminación micina, como gentamicina, netilmicina y sisomicina. Netilmicina es un derivado semisintético modificado (N-etil) de la sisomicina extraída de *Micromonospora inyoensis*.

Cuadro 1. Muestra la relación de 400 cepas de bacterias Gram positivas y negativas y las infecciones oculares de las que fueron aisladas

| Bacteria aislada | Conjuntivitis | Queratitis | Endoftalmitis | Diversas** |
|--|---------------|------------|---------------|------------|
| <i>Staphylococcus</i> (SCN)* | 12 | 54 | 5 | 10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 55 | 14 | 2 | 5 |
| <i>Streptococcus</i> α y β hemolíticos | 23 | 23 | 6 | 5 |
| <i>Bacillus</i> | 3 | 10 | 6 | 6 |
| <i>Actinomyces</i> | 1 | 7 | 1 | 8 |
| <i>Pseudomonas</i> | 14 | 24 | 4 | 8 |
| Enterobacterias | 24 | 20 | 3 | 9 |
| <i>Haemophilus</i> | 10 | 5 | 0 | 2 |
| <i>Acinetobacter</i> | 4 | 12 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria</i> | 2 | 2 | 0 | 1 |
| Total | 148 | 171 | 27 | 54 |

*SCN = *Staphylococcus* coagulasa negativo

**Canaliculitis, celulitis orbitarias y blefaritis

Su mecanismo de acción se inicia con la interacción de iones en la superficie bacteriana, en la que se unen con fuerzas electrostáticas, en una unión pasiva que no depende de energía. Los aminoglucósidos son catiónicos y se unen a las cargas electronegativas de los residuos lipopolisacáridos, las cabezas polares de los fosfolípidos y las proteínas aniónicas de la superficie externa de las bacterias electro negativas. Los aminoglucósidos desplazan a los iones Mg²⁺ y Ca²⁺, que normalmente participan en la unión de los lipopolisacáridos, y la consecuencia es la formación de poros transitorios en la pared celular con la consiguiente salida de iones vitales. El paso siguiente es la entrada del antibiótico por la membrana celular, y en el protoplasma se une en forma irreversible, superando la concentración interna de antibiótico a la externa circundante a la bacteria. La fase más activa de inhibición se efectúa en la interfase de dos unidades ribosomales, la 30S y 50S, o a fracciones más pequeñas dependiendo del aminoglucósido que se trate. El ribosoma se hace incapaz de leer al mARN y se forman proteínas irreconocibles para la bacteria por lo que declina en sus funciones y capacidad reproductiva (1).

MATERIAL Y MÉTODO

Se recuperaron 400 cepas bacterianas de infecciones oculares distribuidas en 9 géneros: 81 *Staphylococcus epidermidis*, 76 *Staphylococcus aureus*, 56 *Streptococcus* de diversas especies, 16 *Actinomyces* y *Corynebacterium*, 25 *Bacillus*, 58 enterobacterias de diversas especies, 50 *Pseudomonas*, 17 *Haemophilus influenzae* y 5 *Neisseria*. A todas se les practicó prueba de susceptibilidad con el método de difusión de Kirby y Bauer a partir de una suspensión de bacterias de un cultivo puro con 24 h de incubación comparable con el tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland. La suspensión se distribuyó con hisopo estéril en forma uniforme sobre la superficie de agar de Muller-Hinton y se depositaron en forma equidistante discos de papel impregnados con amikacina 30 µg, gentamicina 30 µg, tobramicina 30 µg, netilmicina 30 µg, cipro-

floxacina 5 µg, ofloxacina 5 µg, moxifloxacina 5 µg, o gatifloxacina 5 µg. Se incubaron las placas por 24 h para su lectura. Se midieron los diámetros de inhibición para cada disco y se informaron como R = resistente o S = sensible de acuerdo con los milímetros de inhibición de crecimiento medido según Jorgensen (2).

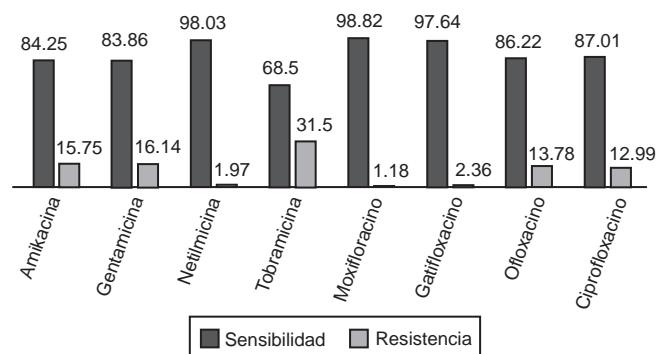
Las cepas bacterianas se recuperaron de diversas infecciones oculares: 37% (148/400) casos de queratitis; 42.8% (171/400) casos de conjuntivitis; 6.8 % (27/400) casos de endoftalmitis y 13.5 % (54/400) de infecciones diversas, como canaliculitis, celulitis orbitarias, blefaritis, una válvula de Ahmaed contaminada y 10 lentes de contacto contaminados (Cuadro 1).

RESULTADOS

La susceptibilidad de los grupos de bacterias Gram positivas y negativas a los 8 antibióticos de mayor uso en oftalmología se muestran en las gráficas 1 y 2.

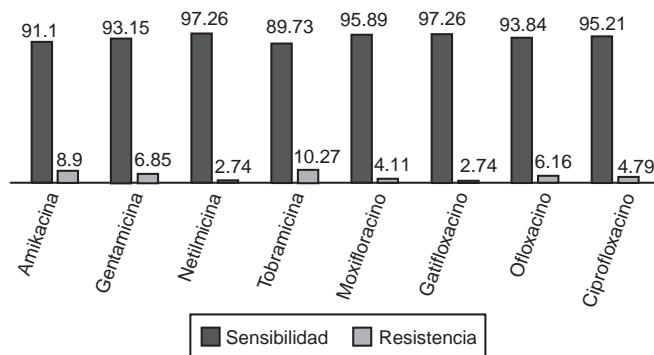
Las susceptibilidades *in vitro* mostraron que, de las 400 cepas recuperadas, 81 *Staphylococcus epidermidis*, 76 *Staphylococcus aureus*, 56 *Streptococcus* de diversas especies,

Gráfica 1. Susceptibilidades de 254 cepas de bacterias Gram positivas a los 8 antibióticos probados

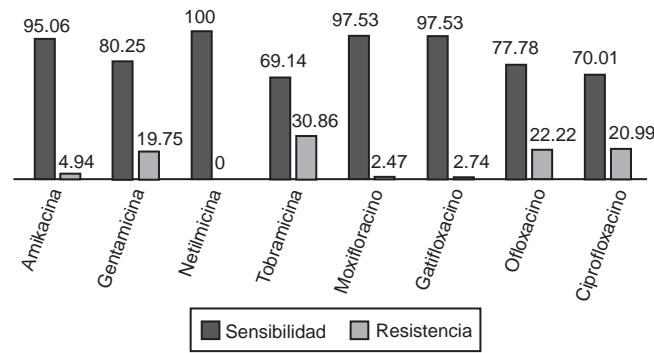


Susceptibilidad a netilmicina en 400 cepas bacterianas aisladas de infecciones oculares

Gráfica 2. Susceptibilidades de 146 cepas de bacterias Gram negativas a los 8 antibióticos probados



Gráfica 3. La mayoría de cepas aisladas de *Staphylococcus* coagulasa negativos de úlceras corneales, presentaron una alta susceptibilidad a netilmicina



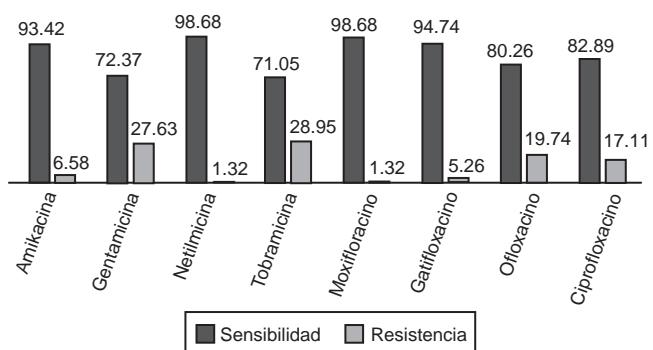
16 *Actinomyces* y *Corynebacterium*, 25 *Bacillus*, 58 Enterobacterias de diversas especies, 50 *Pseudomonas*, 17 *Haemophilus influenzae* y 5 *Neisseria*, el porcentaje de susceptibilidad varió según el género referido (cuadro 2).

Considerando los aislamientos por géneros, la respuesta a los antibióticos fue la siguiente. En las cepas aisladas de *Staphylococcus* coagulasa negativos, en su mayoría *S epidermidis* que fueron 81, la mayor resistencia se presentó para tobra-

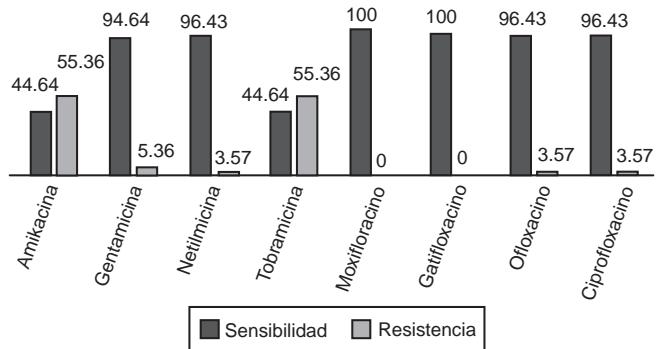
micina y la mayor susceptibilidad para netilmicina con 100% de actividad (Gráfica 3). Para *Staphylococcus aureus* la mayor resistencia se presentó para tobramicina y la susceptibilidad se presentó para netilmicina y moxifloxacin (Gráfica 4).

En las cepas de *Streptococcus* que incluyen 20 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, 20/56 (35.7%) tobramicina y amikacina presentaron altas resistencias y la mayor susceptibilidad la presentaron a gatifloxacina y moxifloxacin (Gráfica 5). Las cepas de enterobacterias aisladas de conjuntiva,

Gráfica 4. Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a los 8 antibióticos probados



Gráfica 5. Amikacina y tobramicina revelan ser poco activos para *Streptococcus*



Cuadro 2. Susceptibilidad de las diversas cepas referidas en porcentaje para cada género con el número de cepas enfrentadas a 8 antibióticos

| Bacterias n = 400 | Amikacina | Gentamicina | Netilmicina | Tobramicina | Moxifloracina | Gatifloxacina | Ofloxacina | Ciprofloxacin |
|---------------------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|------------|---------------|
| <i>Staphylococcus</i> (SCN) 81 | 95.0 | 80.2 | 100.0 | 69.2 | 97.5 | 97.5 | 77.8 | 79.1 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 76 | 93.4 | 72.4 | 98.6 | 71.0 | 98.6 | 94.7 | 80.2 | 82.8 |
| <i>Streptococcus</i> 56 | 45.7 | 72.4 | 98.7 | 71.1 | 98.7 | 94.8 | 80.3 | 82.9 |
| <i>Actinomyces</i> 16 | 100.0 | 93.7 | 87.0 | 87.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 93.7 |
| <i>Bacillus</i> 25 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 96.0 | 96.0 |
| <i>Pseudomonas</i> 50 | 86.0 | 90.0 | 96.0 | 92.0 | 96.0 | 96.0 | 94.0 | 96.0 |
| Enterobacterias 58 | 91.4 | 93.1 | 98.3 | 86.2 | 93.3 | 96.6 | 91.4 | 93.2 |
| <i>Haemophilus</i> 17 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 94.2 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| <i>Acinetobacter</i> 16 | 93.7 | 93.7 | 93.7 | 85.7 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| <i>Neisseria</i> 5 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

córnea y lentes de contacto presentaron una alta susceptibilidad a netilmicina y la más alta resistencia a tobramicina (Gráfica 6). *Pseudomonas* presentó alta susceptibilidad para ciprofloxacina y mayor resistencia a gentamicina y tobramicina (Gráfica 7).

En el análisis estadístico por regresión logística, tuvo significado la comparación entre los resultados de susceptibilidad de la tobramicina y netilmicina con $p > 0.001$ para bacterias Gram positivas, presentando tobramicina una resistencia importante de 31.5% en las cepas probadas, contribuyendo en gran medida las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus* (Gráfica 8).

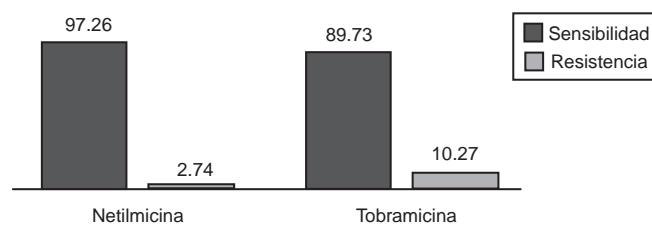
La resistencia de bacterias Gram negativas a la tobramicina se presentó en 10.27% y para netilmicina en 2.7% (Grá-

fica 9). En el grupo de bacterias Gram positivas, que fueron la mayoría (54/400, 63.5%), moxifloxacina fue solamente 0.7% más activa que netilmicina (Gráfica 10).

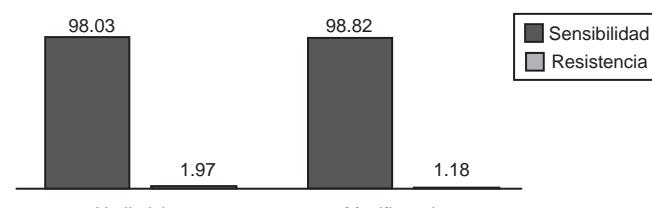
Para el grupo de las bacterias Gram negativas aisladas (146/400, 36.5%), netilmicina fue más activa en 1.37% que moxifloxacina (Gráfica 11).

Comparativamente, para el grupo de bacterias Gram positivas gatifloxacina fue más activa en 0.39% de las cepas probadas (Gráfica 12). Para las cepas bacterianas probadas, netilmicina y gatifloxacina tuvieron una susceptibilidad igual expresada en porcentajes (Gráfica 13).

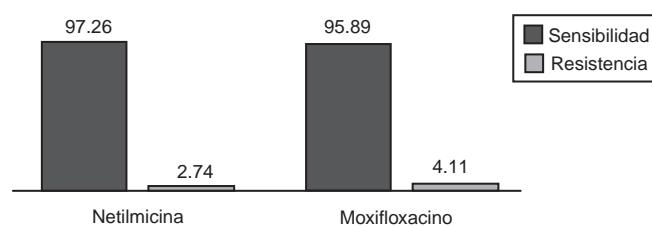
Gráfica 9. Comparativa entre tobramicina y netilmicina para bacterias Gram negativas



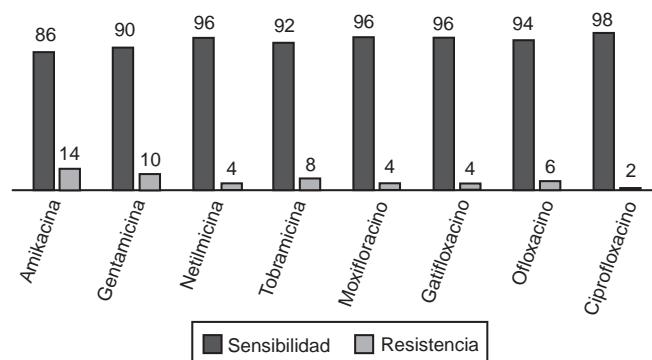
Gráfica 10. Comparativa entre netilmicina y moxifloxacina para bacterias Gram positivas



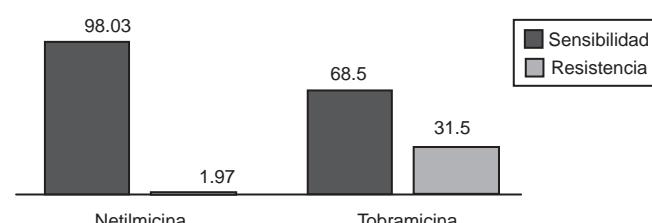
Gráfica 11. Comparativa entre netilmicina y moxifloxacina para bacterias Gram negativas



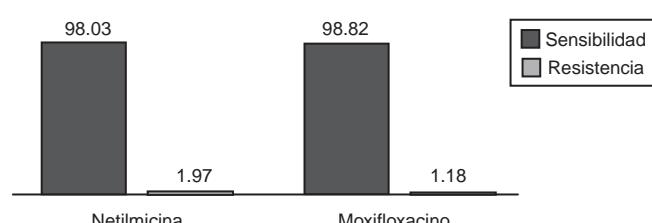
Gráfica 7. Susceptibilidad de pseudomonas a 8 antibióticos

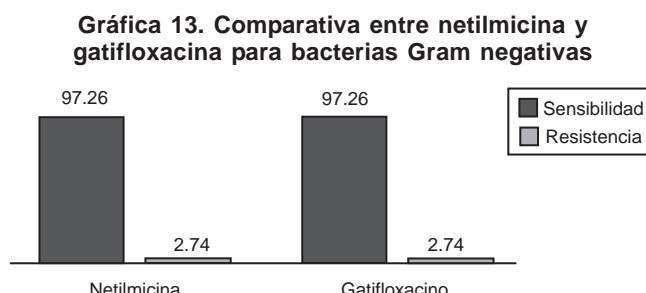


Gráfica 8. Comparativa entre tobramicina y netilmicina en bacterias Gram positivas



Gráfica 12. Comparativa entre netilmicina y gatifloxacina en bacterias Gram positivas





DISCUSIÓN

Dentro del grupo de aminoglucósidos aplicados en la clínica para infecciones sistémicas, netilmicina es el antibiótico que menos uso ha tenido por lo que su actividad sobre poblaciones bacterianas es aún muy aceptable. Es un antibiótico soluble en agua, puede ser administrado por vía tópica ocular, tiene una mínima absorción que alcanza sólo los límites de detección en suero y puede administrarse por períodos prolongados sin efectos sistémicos, por lo que hace ideal su administración en infecciones conjuntivales y palpebrales.

En Europa se llevó a cabo un estudio (3) en 85 ojos de 50 niños, con edades de 0 a 14 años y diagnósticos de conjuntivitis, dacriocistitis congénita, canaliculitis y un caso de mucocèle, causados en su mayoría por *Staphylococcus* y *Streptococcus*, en los que se aplicó sulfato de netilmicina al 0.3%, dos gotas cada 4 horas en saco conjuntival. La evaluación al quinto día mostró mejoría en 50% de los casos, y al décimo día en el 100%. En nuestro estudio la susceptibilidad de las bacterias Gram positivas a la netilmicina fue de 98.03% que incluyeron un importante número de cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Actinomycetes* en total 254 cepas (63.5%).

En otro estudio se analizaron 121 pacientes con cultivos positivos a bacterias patógenas (4), de las Gram positivas o negativas, 96.9% fueron susceptibles a netilmicina y 75% a gentamicina con pruebas estadísticas de $p = 0.001$.

En el presente estudio, la susceptibilidad de las cepas Gram positivas a netilmicina (98%) fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$), más alta que tobramicina (68.5%), contribuyendo para este resultado la acción sobre *Staphylococcus* y *Streptococcus* acorde con el estudio de Milazzo (5), que en un estudio comparativo en las pruebas de susceptibilidad 84% de las bacterias fueron sensibles a netilmicina y 64% a tobramicina. La población bacteriana estuvo compuesta principalmente por *Staphylococcus aureus*.

En los estudios sobre toxicidad existen buenos indicios sobre su tolerancia en células epiteliales de córnea (HCE-T) y células de conjuntiva (Wong-Kilbourne derivadas de Chang) con exposición por 4 a 24 h en concentraciones 0.05 a 5 μ g/ml en un modelo *in vitro*. Ofloxacina demostró tener una alta toxicidad inhibiendo la proliferación celular en 50%, mientras que netilmicina no fue tóxica (6). En el tiempo de permanencia del fármaco en la conjuntiva, netilmici-

na ha demostrado permanecer 120 minutos en concentraciones adecuadas sobre la superficie ocular (7), además de que, como todos los aminoglucósidos, presenta el efecto post-antibiótico *in vitro*, especialmente en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* de 2.4 h y *Staphylococcus aureus* con 1.5 h después de haber estado en presencia de las concentraciones mínimas inhibitorias para cepas bacterianas aisladas de infecciones oculares (8). En este estudio *in vitro*, las susceptibilidades de las cepas probadas demuestran una alta sensibilidad a netilmicina, mejor que a gentamicina y aún mejor que a tobramicina, equiparable con las nuevas quinolonas moxifloxacina y gatifloxacina

CONCLUSIONES

La susceptibilidad a netilmicina de bacterias Gram positivas y negativas recuperadas de infecciones oculares fue mayor que gatifloxacina y moxifloxacina para *Staphylococcus* coagulasa negativos, igual que gatifloxacina para bacterias Gram negativas y mejor que tobramicina para ambos grupos de bacterias.

Agradecimiento

Al doctor José Luis Jardón por el análisis estadístico.

REFERENCIAS

1. Gilbert DN. Aminoglucósidos. En: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Ed Panamericana, Buenos Aires 1997; 309-340.
2. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility test: Dilution and Disk diffusion methods. En: Murray PR, Jo Baron E, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington D. C. 7^a. Ed. 1999; 1526-1543.
3. Papparella AM, De Girolamo N, Piroli C. Use of Netilmicine eye drops in ocular infections in children. Boletino di Oculistica 1994; 75(5):1-4.
4. Papa V, Aragona P, Scuderi AC, Blanco AR, Zola P, Di Bella A, Santocono M, Milazzo G. Treatment of acute bacterial conjunctivitis with topical Netilmicin. Cornea. 2002; 21(1):43-47.
5. Milazzo G, Papa V, Carstocea B, Chercota G, Rodica P, Gafencu O, Santocono M. Topical Netilmicine compared with tobramycin in the treatment of external ocular infections. Inter J Clin Pharma Ther 1999; 37(5): 243-248.
6. Pappa V, Leonardo A, Getuli C, Pacelli V, Russo P, Milazzo G. Effect of Ofloxacin and Netilmicine on human corneal and conjunctival cell in vitro. J Ophthalmol Pharmacol Ther 2003; 19(6); 535-545.
7. Scuderi AC, de Lazzari A, Miano F, Zola P. Residence time of Netilmicin in tears. Cornea 2002; 21(1): 48-50.
8. Bonfiglio G, Scuderi AC, Russo G. Netilmicin: In vitro activity, time-kill evaluation and post-antibiotic effect on microorganism isolated from ocular infections. Chemotherapy 2007; 47: 117-122.