

204

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD O DE LA DEGRADACION,
DE
ANTIMICROBIANOS PREVIAMENTE DILUIDOS Y LIOFILIZADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A

MARIA DEL REFUGIO VALADEZ RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

- I.- Introducción
- II.- Antecedentes
- III.- Objetivos
- IV.- Diagrama del Método
- V.- Materiales y Métodos
 - A. Primera Fase Experimental
 - B. Segunda Fase Experimental
- VI.- Resultados
- VII.- Discusión
- VIII.- Conclusiones
- XI.- Resumen
- X.- Anexo
- XI.- Bibliografía

"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD O DE LA DEGRADACION,
DE
ANTIMICROBIANOS PREVIAMENTE DILUIDOS Y LIOFILIZADOS"

I. INTRODUCCION

La respuesta de susceptibilidad o resistencia, que manifiestan las bacterias en el medio ambiente tiene una gran importancia a nivel hospitalario, ya que los microorganismos patógenos modifican constantemente su respuesta a los antimicrobianos existentes, originando de esta manera un serio problema terapéutico.

Esta situación ha motivado a los investigadores para la búsqueda de métodos, cada vez más precisos y prácticos, con los que se pueda de terminar la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos (antibiograma), pruebas de rutina, muy solicitadas en el laboratorio clínico.

En la práctica médica, tratar una infección con el antimicrobiano adecuado, una vez que se ha establecido el diagnóstico etiológico del padecimiento, requiere de la información adecuada del antibiograma. Los métodos mas frecuentemente utilizados, son los cualitativos, sen cillos y económicos, pero que generalmente no proporcionan datos con fiables para establecer el tratamiento correcto al padecimiento infe cioso; por otra parte, aquellos procedimientos con los cuales se obtienen resultados cuantitativos, que correlacionan adecuadamente con los datos farmacológicos de las sustancias antimicrobianas, son de eje

cución laboriosa y cara.

Con el propósito de solucionar los inconvenientes de los métodos de antibiogramas mencionados, el personal médico y técnico del Departamento de Bacteriología, del Hospital General de México dependiente de la Secretaría de Salud, en su área de antimicrobianos, propuso un nuevo método de antibiograma que, además de ofrecer información cuantitativa, se adaptaría a las necesidades del laboratorio clínico.

En todo nuevo sistema, como el propuesto por el departamento antes citado, es obligado controlar la actividad antimicrobiana presente en el producto final, auxiliándose de un método biológico que permita comprobar si el material liofilizado del nuevo antibiograma es adecuado para las funciones a las que se destinaría, siendo este el motivo principal de realizar el presente trabajo de tesis.

II. ANTECEDENTES

A continuación, se menciona una breve descripción de los principales métodos de antibiograma:

1.- ANTIBIOGRAMA DE DIFUSION.

En esta prueba se utilizan cajas de petri conteniendo un medio de cultivo de agar nutritivo en cuya superficie se distribuye uniformemente, con una asa de alambre o con un hisopo, el microorganismo que previamente ha sido identificado por reacciones bioquímicas y serológicas. Una vez efectuado este procedimiento se colocan, sobre dicha superficie, discos de papel absorbente que han sido impregnados con algún antimicrobiano de concentración conocida.

La base de este método es la difusión del antimicrobiano, a partir del disco, en forma centrífuga en la gelosa adyacente.

Las cajas se incuban a 37°C, durante 24 horas. Los resultados se obtienen al medir, en milímetros, la zona de inhibición del desarrollo bacteriano alrededor de cada disco utilizado (si la bacteria se inhibió frente a la droga), calificando al microorganismo como sensible, medianamente sensible o resistente, según sea el tamaño de los halos encontrados con cada antimicrobiano probado. (1,2,14).

Las ventajas que proporciona este método son: material fácil de preparar, requiere de poco personal calificado y es de bajo costo, por lo mismo es el más empleado en los exámenes de rutina del laboratorio clínico.

Las desventajas que presenta y por lo cual es considerado como un

método cualitativo, se debe a que no hay un control en la cantidad de bacterias inoculadas y los discos empleados suelen en ocasiones, no contener la concentración indicada por los fabricantes (17).

2.- ANTIBIOGRAMA DE DILUCION SERIADA EN TUBO.

Este se realiza en medio de cultivo líquido, preparando tubos que contienen un volumen constante de caldo nutritivo y concentraciones conocidas de antimicrobiano.

Aislado e identificado previamente el germen problema, se prepara un inóculo en caldo nutritivo, se lleva a incubación durante 4 horas a 37°C resultando una cantidad de bacterias de 1×10^9 /ml. aproximadamente, se hacen las diluciones necesarias de este inóculo inicial y se inocula en cada tubo con caldo nutritivo una cantidad aproximada de 1×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Después de 18 horas se efectúa la lectura, tomando en cuenta la turbidez del medio de cultivo, lo que indica si existe o no desarrollo bacteriano. (2)

Los resultados se expresan en términos de concentración inhibitoria mínima (C.I.M.), en microgramos por mililitro, que es la mínima concentración de la droga que inhibió el microorganismo en estudio.

Las ventajas que presenta este antibiograma y por lo cual se considera como un método cuantitativo, es el manejo de un inóculo controlado, la cantidad de antimicrobiano conocida y la información de los resultados en términos de C.I.M., proporcionando al médico orientación sobre el comportamiento bacteriano a los antimicrobianos existentes.

3.- ANTIBIOGRAMA DE DILUCION SERIADA EN PLACA DE AGAR.

Este sistema es similar al anterior; en él, la droga, en concentraciones conocidas, se mezcla con el agar nutritivo.

Identificados adecuadamente los gérmenes de estudio, se preparan los inóculos de cada uno y cuando se han solidificado las placas se inoculan, con el inoculador mecánico, 1×10^6 UFC aproximadamente. En cada placa es posible probar un gran número de cepas, que ya inoculadas se mantienen en la estufa a 37°C durante 18 horas.

La lectura se hace observando si hay desarrollo de colonias del microorganismo en el sitio inoculado y los resultados se expresan en C.I. M. mcg/ml. (2,11,50)

En este método de antibiograma se controla aproximadamente la cantidad de microorganismos, las concentraciones de los antimicrobianos y además proporciona al médico información cuantitativa de la acción de la droga sobre el microorganismo.

Las desventajas de este procedimiento son: la compleja y laboriosa preparación de material por personal calificado, lo que eleva considerablemente sus costos.

4.- ANTIBIOGRAMA DE SZYBALSKI.

Es un método ingenioso en el que se logran concentraciones decrecientes de antimicrobiano, en la misma caja, al difundirse el antimicrobiano de una capa superior hacia una capa inferior.

Los aislamientos bacterianos identificados y purificados, a los cuales se les desea practicar el estudio, se estandarizan hasta tener una cantidad aproximada de 1×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por

milímetro, con pinceles delgados y previamente esterilizados (se utiliza uno por cada aislamiento), se siembran los microorganismos en línea recta, en la misma dirección del gradiente de concentración establecido. Se incuban las placas a temperatura de 37°C durante 18 horas.

Si existe presencia de desarrollo bacteriano a todo lo largo de la línea inoculada podremos inferir, aproximadamente, las concentraciones que impiden su desarrollo. (2,45).

La ventaja de este antibiograma es que utiliza poco personal calificado y material para la exploración de un gran número de gérmenes.

La desventaja que presenta como auxiliar para el clínico en el tratamiento terapéutico adecuado, es la información de la tendencia a la "susceptibilidad" o "resistencia" bacteriana.

5.- METODO DE ANTIBIOGRAMA DE BAUER Y KYRBI.

Este método es semejante al de discos, sólo que la metodología recomendada requiere de la estandarización de todos los procedimientos que se emplean. Los datos que aporta este sistema han sido correlacionados con métodos más precisos, como el de dilución seriada en caldo nutritivo.

La lectura se efectúa midiendo en milímetros los halos de inhibición en torno a cada disco y los resultados se comparan con la tabla recomendada por los autores, calificando a la bacteria como, sensible, con susceptibilidad intermedia o como resistente, a los antimicrobianos empleados. (2,4,5)

Este procedimiento es de bajo costo, ya que requiere de poco material, mínimo personal calificado y tiempo de elaboración.

El inconveniente que presenta es que solamente puede aplicarse a los bacilos Gram-negativos aerobios y a las micrococáceas. (51)

III.- OBJETIVOS

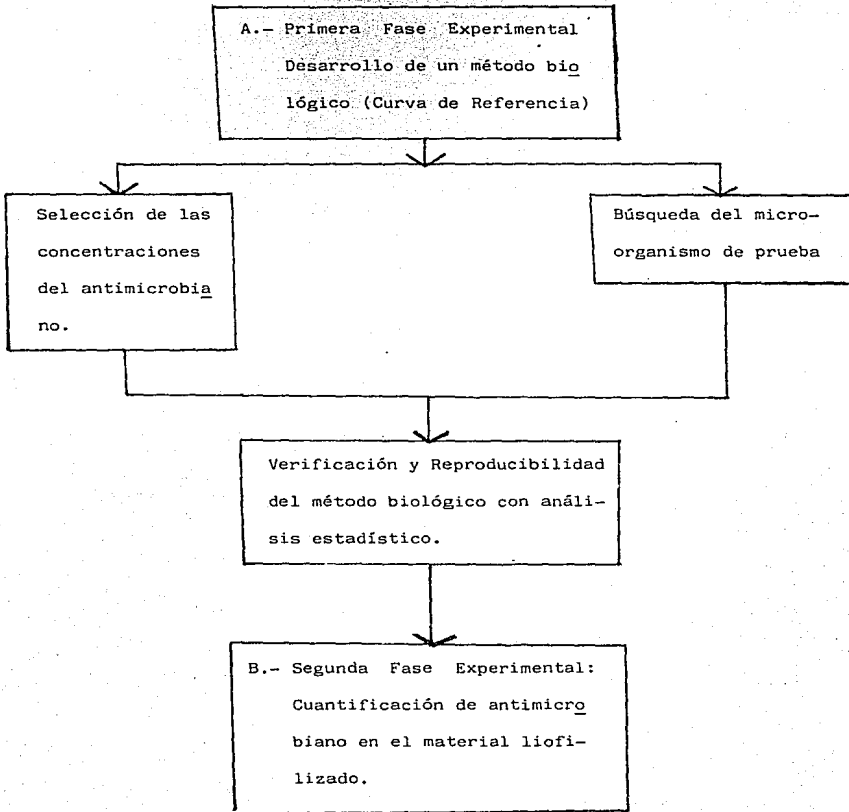
Con el propósito de reducir los inconvenientes de los métodos de antibiograma empleados en el laboratorio de rutina del medio hospitalario y presentar una información adecuada sobre respuestas de susceptibilidad bacteriana al médico, la presente investigación tiene como objetivos:

1.- El desarrollo de un método biológico que sea eficaz para determinar cuantitativamente la actividad o degradación de los antimicrobianos pertenecientes al grupo de los beta lactámicos: Ampicilina, Dicloxacilina, Cefaloridina, Cafalotina y Penicilina. Sometiendó los resultados al análisis estadístico, para verificar su validez

2.- Determinar si la actividad de los antimicrobianos, previamente diluidos y liofilizados, se conserva o se degrada.

IV.- DIAGRAMA DEL METODO.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



V.- MATERIALES Y METODOS

A.- Primera Fase Experimental: tiene como objetivo, el desarrollo de un método biológico (Curva de Referencia), que servirá para cuantificar la actividad antimicrobiana (27,49).

En el diseño del método biológico empleado para medir la concentración de antimicrobiano, se utiliza una cepa de clasificación internacional de la "American Type Culture Collection" (Bacillus subtilis - ATCC-6633)(3), germen susceptible a los antimicrobianos en estudio.

Los antimicrobianos probados pertenecen al grupo de los beta lactámicos: Ampicilina, Dicloxacilina, Cefaloridina, Cefalotina y Penicilina.

Las concentraciones de los Fármacos elegidas para el procedimiento de curva de referencia fueron: 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 mcg/ml. Con el fin de estandarizar el sistema estas concentraciones fueron las mismas para todas las drogas mencionadas.

En términos generales, en el desarrollo del método biológico llamado curva de referencia, se utiliza una base de medio de cultivo sólido (Antibiotic Medium No. 2, Difco, pH 6.6) en una caja de petri de 20 x 100 mm.

Se colocan, sobre la superficie del medio de cultivo un grupo de cilindros a los cuales se adiciona 0.8 ml. de antimicrobiano de concentración conocida, cuyos cálculos de diluciones y concentraciones se encuentran en la Tabla 1; en el caso de la penicilina para transformar U/ml. a mcg/ml., se utilizó la constante de transformación (K), que corresponde a 620 mg = 1000 U.I. de penicilina bencílica sódica. Se in-

TABLA 1

SOLUCIONES ESTANDAR:

Sol. Madre (S.M)....	20 mg. de Antimicrobiano*	
	20 ml. de solvente**	= 1000 mcg/ml.
Sol. I.....	1.0 ml. de (S.M)	
	9.1 ml. de solvente	= 100 mcg/ml.
Sol. II.....	1.0 ml. de Sol. I	
	9.0 ml. de Solvente	= 10 mcg/ml.

CONCENTRACIONES DE CURVA ESTANDAR:

Solución	Procedimiento	Concentración en mcg/ml.
(1).....	4 ml. de Sol. II	
	6 ml. de solvente	4.0
(2).....	5 ml. de Sol.(1)	
	5 ml. de solvente	2.0
(3).....	5 ml. de Sol. (2)	
	5 ml. de solvente	1.0
(4).....	5 ml. de Sol.(3)	
	5 ml. de solvente	0.5
(5).....	5 ml. de Sol. (4)	
	5 ml. de solvente	0.25

* Se utilizaron las sales del antimicrobiano tomando en cuenta su potencia biológica.

**Se empleó como solvente de todos los antimicrobianos agua destilada y esterilizada.

cubaron las cajas a 37°C. El antimicrobiano contenido en los cilindros difunde en la gelosa y la presencia de la droga en torno al cilindro de termina las zonas (halos) de inhibición del germen de prueba.

Desarrollo del Método Biológico:

Selección del microorganismo de prueba. Se utilizó Bacillus subtilis ATCC-6633, estandarizando el inóculo de la suspensión de esporas al 85% de transmitancia en un fotocolorímetro.(Anexo A)

Preparacion de las Placas de Gelosa

Se colocan en una mesa calibrada (Fig. 1), cajas de petri con 10 ml de medio de cultivo esterilizado (primera capa base); por este procedimiento se nivela la superficie de la caja, dejando solidificar las placas durante 30 minutos.

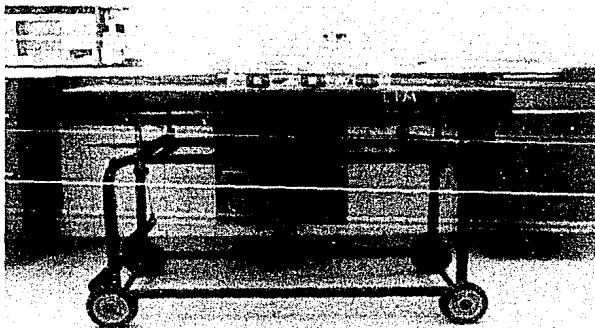


Fig. 1 Mesa calibrada utilizada en la preparación de las placas de petri.

En seguida se coloca la segunda capa de gelosa a la cual se le agregó el microorganismo de prueba (segunda capa de gelosa inoculada), el medio de cultivo se mantiene a 48°C antes de inocular los gérmenes. Esta temperatura no es necesaria para las esporas bacterianas, ya que éstas nos permiten trabajarlas a mayor temperatura.

La gelosa inoculada se preparó con esporas del bacilo, agregando el volumen necesario de la suspensión de esporas en 100 ml. de gelosa (Antibiotic Medium No. 2) para obtener el 85% de transmitancia.

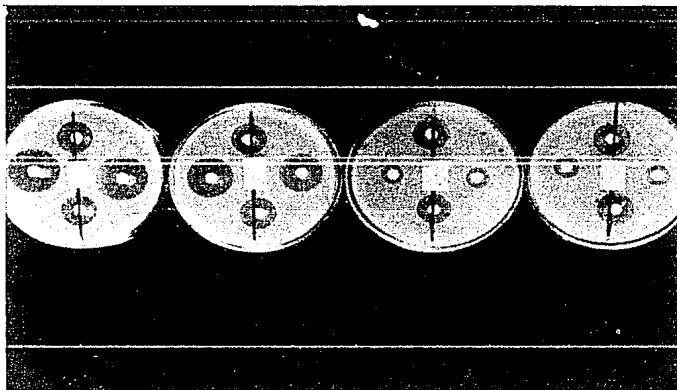
Se colocaron sobre la primera capa base, 6 ml. de gelosa inoculada repartiendo uniformemente por movimiento de rotación hasta cubrir totalmente la capa anterior. Este material se conserva en refrigeración, hasta el momento de usarse, que no debe exceder a las 24 horas de su preparación.

Selección de los halos adecuados de inhibición.

Se tomaron en cuenta solamente halos nítidos; los poco definidos, festonados o dobles se eliminaron del sistema Fig. 2

Construcción del Sistema de Curva de Referencia.

Se utilizaron series de cinco cajas de petri, con medio de cultivo base y gelosa inoculada para cada una de las concentraciones de la curva. Se colocaron sobre la segunda capa de gelosa inoculada y solidificada, tres cilindros de acero inoxidable (Fisher Scientific Co. Penycylinder, No. de Catálogo 7-907-5), en uno de ellos se adicionó 0.8 ml. de antimicrobiano de concentración conocida y en los dos cilindros restantes, se colocó 0.8 ml. de concentración de 1.0 mcg/ml. Esta concen



A

B

C

D

Fig. 2 Los halos de inhibición de las cajas de Petri A, C, D, fueron eliminados por no reunir las características requeridas para el experimento, los halos de inhibición de la caja B fueron los utilizados.

tración intermedia en el sistema nos marca el punto de referencia llamado (P.R.), Fig. 3.

Posteriormente se cubrieron las cajas con rodela de papel filtro (cuya función fue absorber el agua de condensación), colocando finalmente la tapa de la caja de petri. Se incubaron las placas en la estufa a 37°C durante 16 horas, realizando posteriormente la lectura de los datos obtenidos.

Lectura e interpretación. Después del tiempo de incubación se retiraron los cilindros de las placas de petri y con la iluminación de una cuenta colonias (Darkfiel Quebec, modelo 3330), se midió con un vernier, el diámetro de los halos formados, expresando los resultados en milímetros y anotándolos en tablas especialmente diseñadas para este experimento.

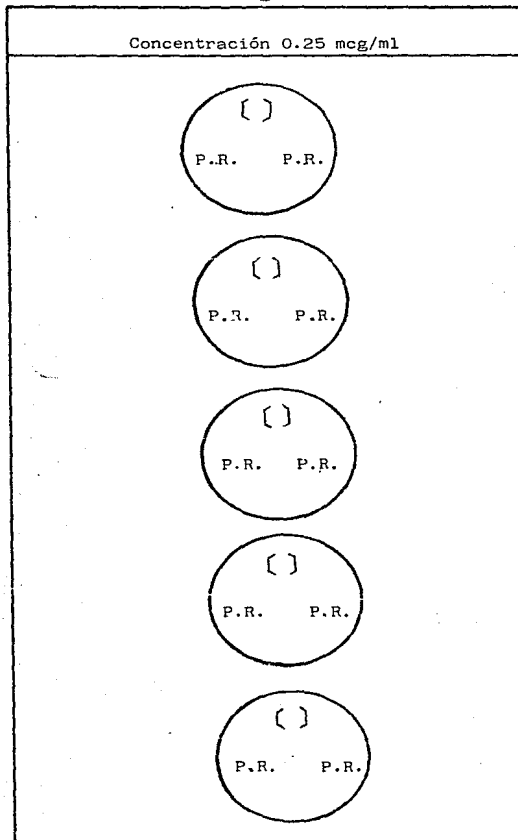
Para cada una de las concentraciones de la curva de referencia se obtuvieron cinco valores y cuarenta para los puntos de referencia (P.R.) por ejemplo: Ampicilina - Tabla 2.

Corrección de los valores. Para efectuar la corrección del sistema, se obtuvo la suma total y promedio de los valores del P.R., comparando este con el P.R. promedio encontrado en cada una de las pruebas de las concentraciones conocidas. Si se encontró diferencia (Positiva o Negativa), se hizo la corrección al valor promedio de cada concentración conocida. Por ejemplo en el caso de la ampicilina:

Promedio total de los valores de P.R.16.28 mm.
Promedio de los valores de P.R. de las
pruebas realizadas con la Concentración de 0.25 mcg/ml.16.25 mm.

Sistema de Curva de Referencia

Fig. 3



Observaciones:

- $\{\}$ Concentración conocida
P.R. Punto de referencia (1.0 mcg/ml)

Esta serie de 5 cajas se repite para cada una de las concentra
ciones conocidas.

Lectura de los valores de la curva de referencia y corrección del Sistema

Antimicrobiano: Ampicilina

Tabla: 2

	P.R	0.25	P.R.	0.5	P.R	2.0	P.R	4.0
	16.0	12.0	17.0	15.0	16.0	17.5	16.0	21.0
	17.0		17.0		16.0			
	17.0	12.0	16.0	15.0	16.0	18.5	16.0	20.5
	16.0		16.0		16.0			
	16.0	13.0	15.5	14.5	16.0	19.0	16.0	21.0
	16.0		16.0		17.0			
	16.0	13.0	17.0	15.0	16.0	18.5	17.0	21.5
	16.0		17.0		16.0			
	16.0	13.0	16.5	15.0	16.0	19.0	17.0	21.0
	16.5		16.0		16.0			
Suma	16.25	63	164	74.5	161	92.5	164	105
Promedio	16.25	12.6	16.4	14.9	16.1	18.5	16.4	21.0
Corrección	+0.03	12.63	-0.12	14.78	+0.18	18.68	-0.12	20.88

$$\begin{aligned}
 P.B, a= 12.63 & \quad P.B.= \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 12.57 \\
 b= 14.78 & \\
 c= 16.28 & \\
 d= 18.68 & \\
 P.A, e= 20.88 & \quad P.A.= \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 20.73
 \end{aligned}$$

Suma total del P.R = 651.5

Promedio total del P.R = 16.28

Valor promedio de esta concentración12.60 mm.

Factor de corrección+ 0.03

Valor corregido de la prueba de 0.25 mcg/ml12.63 mm.

Los datos experimentales y las correcciones a cada uno de los valores promedio de las concentraciones empleadas para ampicilina se pueden observar en la Tabla 2.

Trazo de la Curva de Referencia. Con los valores corregidos de to dos los valores obtenidos de las pruebas realizadas a las concentraciones conocidas y los puntos de referencia del sistema, se trazó la línea de los datos experimentales, con cinco puntos, empleando para ello papel semilogarítmico de dos ciclos, anotando en el eje de las abcisas, las lecturas de los halos de inhibición expresadas en milímetros y en el eje de las ordenadas, la concentración del antimicrobiano en mcg/ml.

Trazo y Corrección de los valores experimentales. Con el objeto de obtener una línea recta, se emplearon las siguientes fórmulas:

a) Punto Bajo de la línea (P.B.)

$$P.B. = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

b) Punto Alto de la línea (P.A.)

$$P.A. = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Siendo el significado de las literales el siguiente:

a = El valor de la concentración de 0.25 mcg/ml.

b = El valor de la concentración de 0.5 mcg/ml.

c = El valor de la concentración intermedio (P.R.) de 1.0 mcg/ml

d = El valor de la concentración de 2.0 mcg/ml.

e = El valor para la máxima concentración empleada, 4.0 mcg/ml.

Conocidos los valores para cada una de las literales, se sustituyen en las ecuaciones de punto alto y punto bajo, haciendo el trazo correspondiente. ejem. Ampicilina - Gráfica 1.

Se construyeron siete curvas de referencia para cada antimicrobiano seleccionado, de acuerdo al tamaño mínimo de muestra.

La verificación y reproductibilidad del método biológico se hizo con el análisis estadístico, comparando el método de punto alto y punto bajo, con el método de mínimos cuadrados y banderas de dispersión, consultar Apéndice B (47, 49).

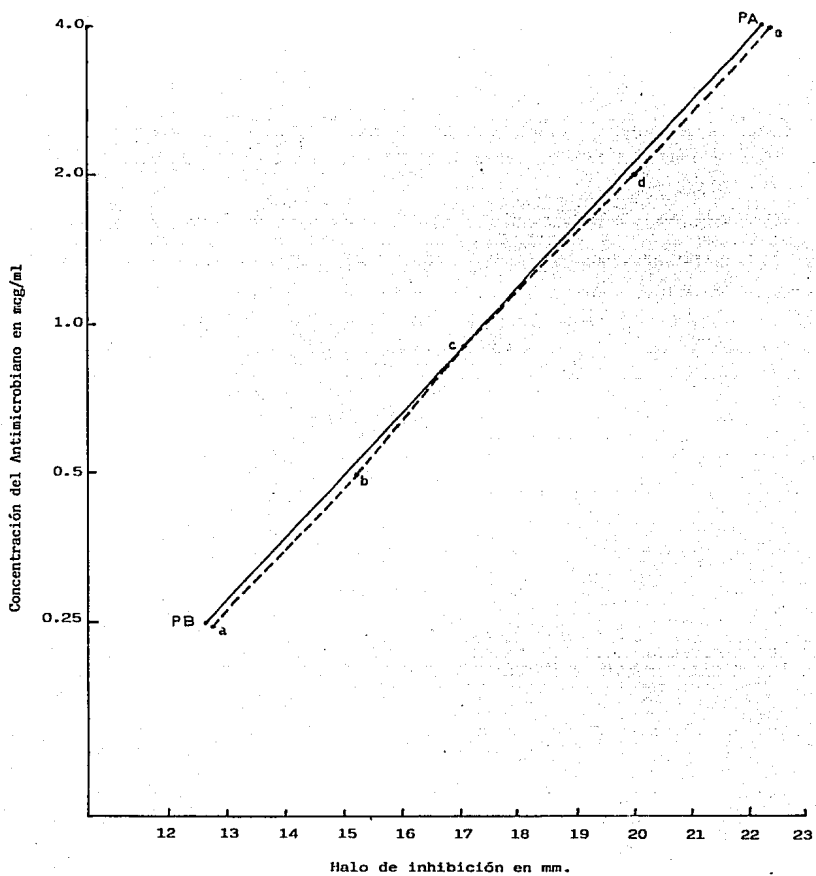
B.- Segunda Fase Experimental:

El material previamente preparado por el Departamento de Investigación Médica consistía, en un medio de cultivo con concentraciones conocidas de antimicrobianos liofilizados, una máxima que correspondía a la del nivel hemático óptimo del fármaco cuando es administrado en el humano a dosis terapéuticas y una mínima presente en la sangre, al final de su período de actividad.

Este sistema se fundamentó en el método de dilución seriada en tubo, ya descrito.

Para determinar la actividad presente de los antimicrobianos en este material liofilizado y rehidratado, se realizaron las siguientes pruebas experimentales:

Se construyeron curvas de referencia para cada uno de los antimicrobianos seleccionados para el estudio, teniendo como base las concentra-



Gráfica 1. Curva de Referencia de Ampicilina
 Cepa de prueba Bacillus subtilis
 Línea de datos experimentales - - - - -
 Línea de datos corregidos _____

ciones probadas en la primera fase experimental y la cepa probada de Bacillus subtilis ATCC-6633.

Se colocaron 0.8 ml. de material liofilizado y rehidratado (Tabla 3) en los cilindros de acero inoxidable de las placas de petri que previamente se habían preparado y se corrió curva de referencia.

Se sometieron a temperatura de 37°C, durante 18 horas, se retiraron los cilindros y se hizo la lectura, midiendo con el vernier el diámetro de los halos de inhibición.

Estos resultados fueron sumados, promediados y corregidos con los de la curva de referencia y representados en una gráfica en papel semilogarítmico de dos ciclos en la que se interpolaron sobre la curva de referencia, mm contra mcg/ml para obtener la concentración real del problema liofilizado y rehidratado, por ejemplo Ampicilina - Tabla 4, Gráfica 2.

Al material liofilizado se le practicaron pruebas de esterilidad para buscar posibles contaminantes.

La selección de los frascos ampula con material liofilizado a los cuales se les practicó cuantificación de antimicrobiano se hizo por números aleatorios (12,31) y se tomaron siete con la máxima concentración y siete con la mínima concentración de antimicrobiano, se rehidrataron con el volumen original y a partir de este material se hicieron diluciones o reconcentraciones. Un ejemplo de como se procesaron estas muestras problema lo encontramos en la Tabla 5.

Una vez probadas las muestras problema en el sistema de curva de referencia, se hizo la lectura de los halos de inhibición que pudiera ser interpolada en el sistema para cuantificar su actividad Tabla No. 6.

TABLA 3

Material en el que se verificó la actividad de
antimicrobiano

Material Liofilizado	Concentración Máxima	Concentración Mínima
AMPICILINA	5.0 mcg/ml.	0.5 mcg/ml.
CEFALORIDINA	30.0 mcg/ml.	0.5 mcg/ml.
CEFALOTINA	30.0 mcg/ml.	0.5 mcg/ml.
DIDLOXACILINA	5.0 mcg/ml.	0.5 mcg/ml.
PENICILINA	2.0 mcg/ml.	0.5 mcg/ml.

Observaciones:

Se utilizó solución salina esterilizada para rehidratar el material liofilizado.

Las concentraciones de los antimicrobianos se eligieron de acuerdo a los niveles hemáticos.

Estas concentraciones de las drogas se encontraban en el material antes de la liofilización.

Lectura de los valores y Curva de Referencia del Problema Liofilizado

Antimicrobiano: Ampicilina

Tabla: 4

P.R.	0.25	P.L.	P.R.	0.5	máxima P.L.	P.R.	2.0	máxima P.L.	P.R.	4.0	mínima P.L.	
15.5			17.5			17.5			15.5		No	
15.5	12.0	5.5	15.0	14.5	9.5	16.5	17.5	15.0	16.0	21.5	detectable	
16.0			17.5			17.0			17.0			
16.0	12.5	5.0	17.0	15.0	9.5	15.5	17.0	15.0	16.5	20.0	"	
16.5			16.5			15.5			17.5			
17.0	12.0	5.5	16.5	15.0	9.0	17.0	18.0	14.0	17.5	20.5	"	
15.0			15.0			15.0			17.5			
17.5	13.0	5.5	17.0	15.0	9.5	17.5	18.5	14.5	17.5	21.0	"	
15.5			17.5			15.5			15.5			
15.0	12.0	5.0	16.0	14.0	10.0	15.5	18.0	14.5	16.0	20.5	"	
Suma	159.5	61.5	26.5	165.5	73.5	47.5	162.5	89.0	73.0	166.5	103.5	"
Promedio	15.95	12.3	5.3	16.55	14.7	9.5	16.5	17.8	14.6	16.65	20.7	"
Corrección	+0.40	12.7	5.7	-0.20	14.5	9.3	-0.15	17.7	14.5	-0.30	20.4	"

$$P.B, a = 12.7 \quad P.B = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 12.61$$

$$b = 14.5$$

$$c = 16.3$$

$$d = 17.7$$

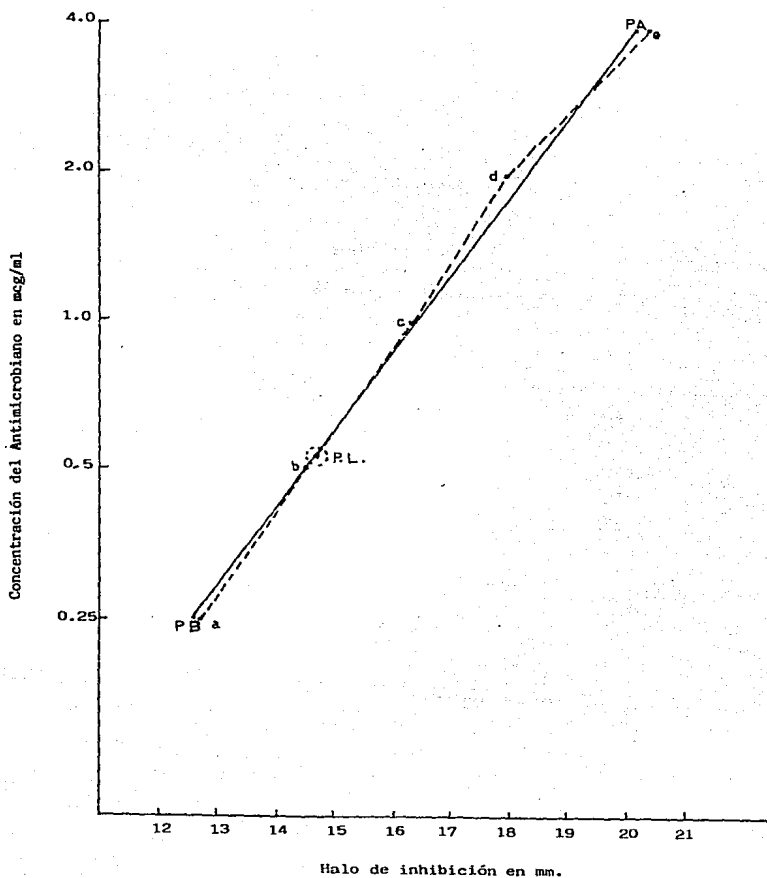
$$P.A, e = 20.4 \quad P.A = \frac{3e + 2d + c - b}{5} = 20.13$$

Suma total del P.R. = 654

Promedio total del P.R = 16.35

Corrección del P.L = 0.53

Máxima concentración



Gráfica 2. Curva de Referencia de Ampicilina
Cepa de prueba Bacillus subtilis

Línea de datos experimentales - - - - -

Línea de datos corregidos _____

Lectura del Problema Liofilizado (P.L.)

TABLA 5

DILUCIONES DEL MATERIAL PROBLEMA LIOFILIZADO CONTENIDO EN LOS FRASCOS

AMPULA - Ampicilina

Máxima concentración marcada: 5.0 mcg/ml.

Concentraciones elegidas para titulación; 5.0, 2.5, 1.25 mcg/ml .

FRASCO AMPULA CON:	SOLVENTE	CONCENTRACION REHIDRATADA
1a. 25 mcg-Antimicrobiano	5 ml.	5.0 mcg/ml
2a. 3 ml. de la (1a)	3 ml.	2.5 mcg/ml
3a. 3 ml. de la (2a)	3 ml.	1.25 mcg/ml

Mínima concentración marcada: 0.5 mcg/ml.

Concentraciones elegidas para titulación; 2.50, 1.25 mcg/ml.

FRASCOS AMPULA CON:	SOLVENTE	CONCENTRACION REHIDRATADA
1a. 2.5 mcg-Antimicrobiano	2 ml.	1.25 mcg/ml.
2a. 0.5 mcg/ml	1 ml.	2.5 mcg/ml

El solvente utilizado para rehidratar los antimicrobianos liofilizados fue: Agua salina esterilizada.

TABLA 6

ACTIVIDAD DETECTADA DEL MATERIAL PROBLEMA LIOFILIZADO

No. DE ENSAYOS	AMPICILINA	
	MAXIMA CONCENTRACION (5.0 mcg/ml)	MINIMA CONCENTRACION (0.5 mcg/ml.)
1	0.53	No - detectable
2	0.41	No - detectable
3	0.53	No - detectable
4	0.62	No - detectable
5	0.57	No - detectable
6	0.84	No - detectable
7	<u>0.26</u>	No - detectable
\bar{X}	0.53	

Concentración Máxima 5.0 mcg/ml = 10% de actividad antimicrobiana encontrada.

Concentración Mínima 0.5 mcg/ml. = No detectable.

VI. RESULTADOS

A Primera fase experimental:

El desarrollo del método biológico (curva de referencia), para cada uno de los antimicrobianos que se utilizaron en este trabajo experimental, mostró reproducibilidad para determinar la conservación de la actividad en concentraciones conocidas de estas sustancias.

En las tablas 7,8,9,10 y 11, encontramos los valores promedio de cada una de las curvas de referencia de los antimicrobianos probados en el estudio. Se puede apreciar el comportamiento de las pruebas experimentales y los datos obtenidos, haciendo los trazos correspondientes en las gráficas 3,4,5,6 y 7, se realizarón las correcciones al sistema por medio de las ecuaciones de punto alto y punto bajo, trazando la línea de regresión en cada uno de los casos.

Utilizando el método de Mínimos cuadrados, se obtuvieron los resultados que encontramos en las Tablas 12, 13, 14, 15 y 16. El trazo correspondiente a los valores ajustados teóricamente por este método se hizo en papel semilogarítmico de dos ciclos. Gráficas 8, 9, 10, 11 y 12. Al hacer la correlación de los dos métodos mencionados encontramos similitud entre los valores experimentales y los teóricos de los modelos ma temáticos empleados, estos resultados fueron corroborados mediante la fórmula de banderas de dispersión (Apendice-B), y no se representaron en la gráfica por tener una variación del orden de centésimas.

Las diferencias encontradas entre los resultados experimentales y los valores teóricos, derivados de las correcciones con las ecuaciones de punto alto y punto bajo, fueron analizados estadísticamente por la prueba de X^2 , encontrando también en este caso que las diferencias no son significativas:

Lectura de los valores de las Curvas de Referencia y correcciones

ANTIMICROBIANO: Ampicilina

Fase Experimental A

TABLA No. 7

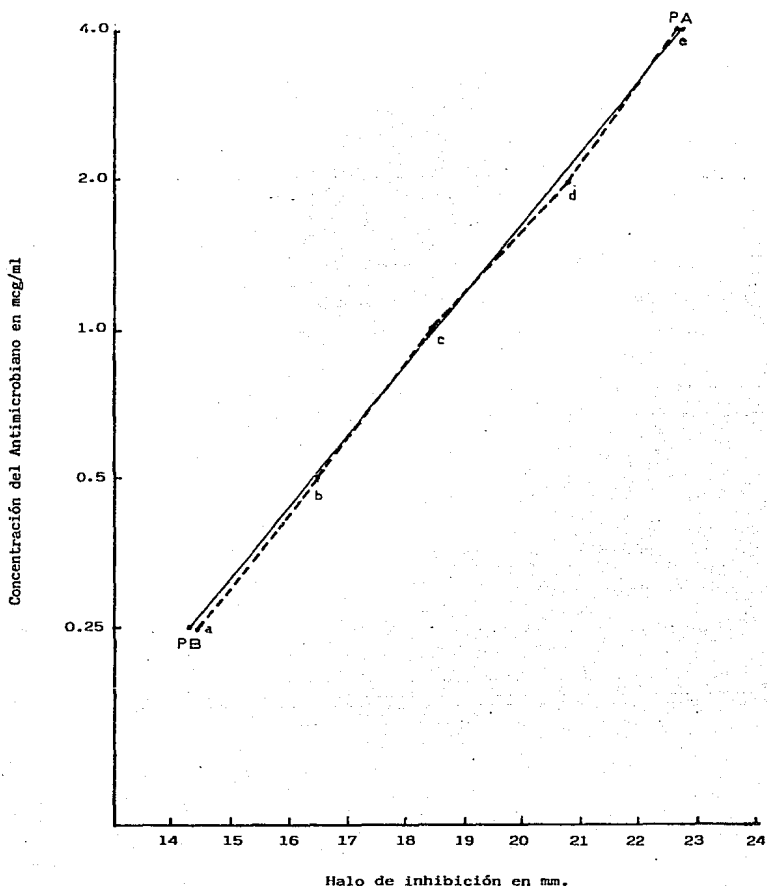
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y conc.	X ₁ mm.	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	\bar{X}
0.25	15.2	12.6	14.0	16.2	14.0	14.4	14.5	14.4
0.5	17.6	14.9	16.0	18.0	15.8	16.3	15.9	16.4
1.0	20.1	16.7	17.8	20.5	18.2	17.6	18.0	18.4
2.0	22.0	18.5	19.1	22.8	20.2	21.1	21.0	20.7
4.0	23.7	21.0	21.4	24.8	21.8	23.8	22.7	22.7

METODO DE PUNTO BAJO Y PUNTO ALTO:

1. Con las columnas 1 y 9, se grafican datos experimentales.
2. Con las columnas 1 y 9, se grafican recta por método de punto bajo y punto alto.

$$P.B. = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 14.3$$

$$P.A. = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 22.7$$



Gráfica 3. Curva de Referencia de Ampicilina
 Cepa de prueba Bacillus subtilis
 Línea de datos experimentales - - - - -
 Línea de datos corregidos _____

Lectura de los valores de las Curvas de Referencia y correcciones

ANTIMICROBIANO: Cefaloridina

Fase Experimental A

TABLA No. 8

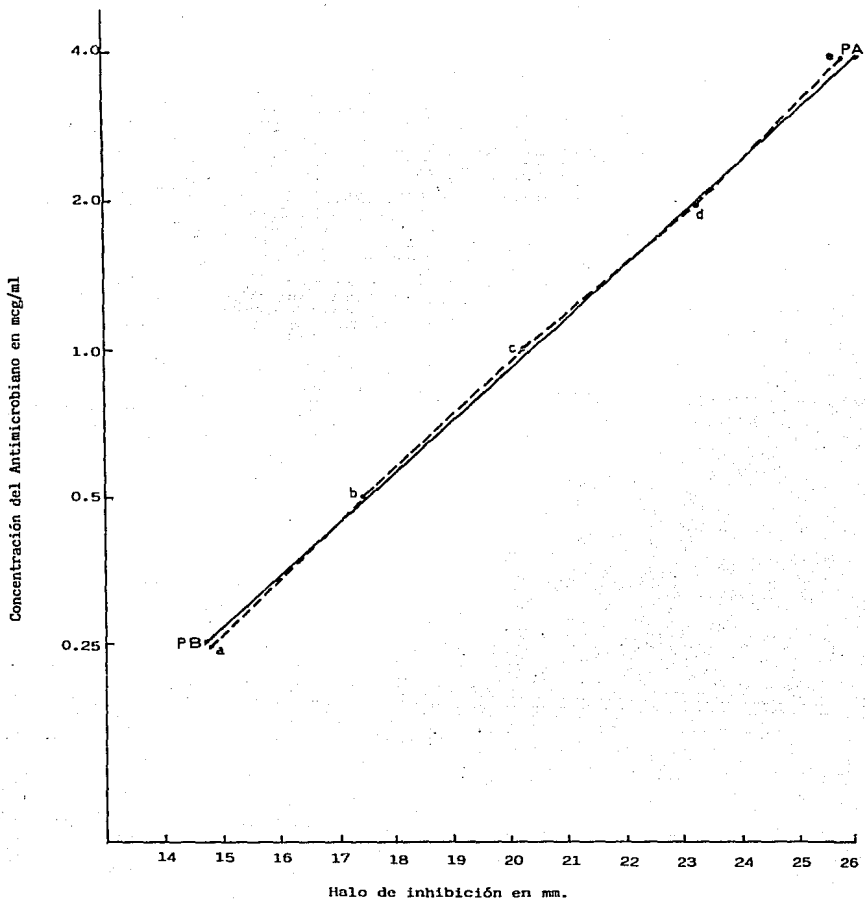
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y conc.	X ₁ mm.	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	\bar{X}
0.25	15.87	14.80	17.43	13.23	14.85	14.92	12.28	14.76
0.5	18.82	28.80	20.11	15.03	17.85	17.92	14.23	17.44
1.0	21.62	21.60	22.81	17.58	19.95	20.82	16.93	20.18
2.0	25.07	24.78	26.13	19.98	23.05	23.02	19.98	23.14
4.0	27.92	27.80	28.31	22.93	25.45	26.22	22.18	25.83

METODO DE PUNTO BAJO Y PUNTO ALTO:

1. Con las columnas 1 y 9, se grafican datos experimentales.
2. Con las columnas 1 y 9, se grafican recta por método de punto bajo y punto alto.

$$P.B. = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 14.7$$

$$P.A. = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 26.0$$



Gráfica 4. Curva de Referencia de Cefaloridina

Cepa de prueba Bacillus subtilis

Línea de datos experimentales - - - - -

Línea de datos corregidos _____

Lectura de los valores de las Curvas de Referencia y correcciones

ANTIMICROBIANO: Cefalotina

Fase Experimental A

TABLA NO. 9

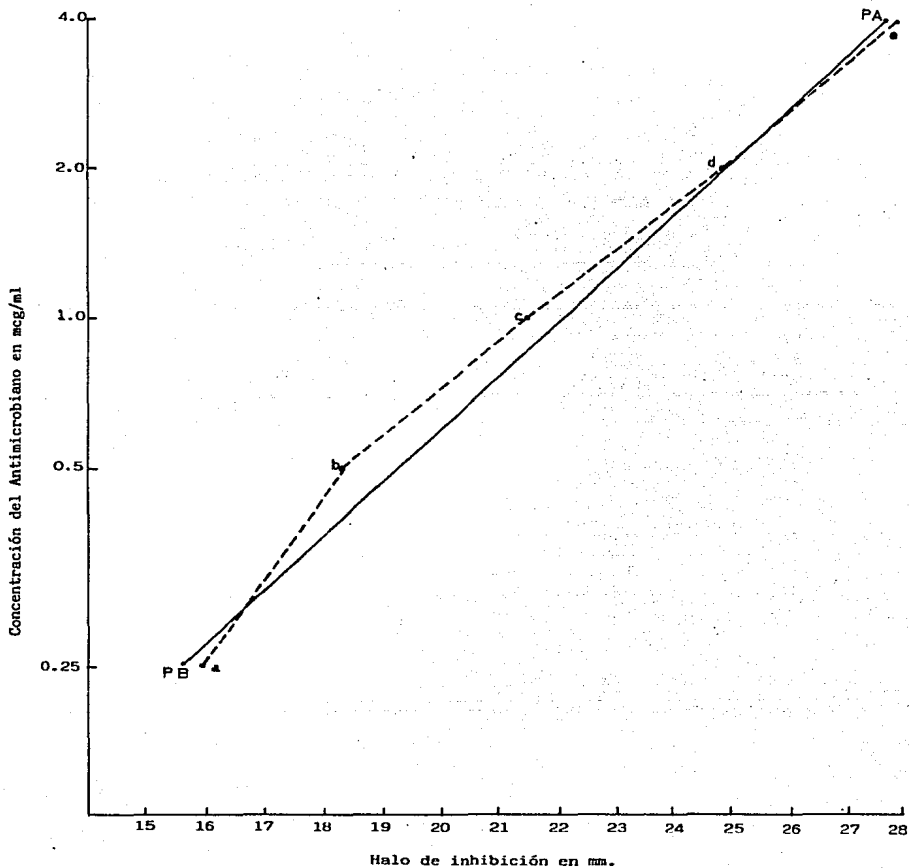
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y conc.	X ₁ mm.	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	\bar{X}
0.25	17.07	17.70	15.35	16.81	16.65	17.31	15.70	16.65
0.5	19.37	20.00	18.05	18.86	19.65	20.16	18.60	19.30
1.0	21.97	22.90	22.50	22.71	22.35	22.96	22.70	22.58
2.0	25.77	27.10	26.60	26.19	25.05	24.96	26.80	26.06
4.0	29.97	30.00	29.80	31.31	27.65	28.76	29.90	29.48

METODO DE PUNTO BAJO Y PUNTO ALTO:

1. Con las columnas 1 y 9, se grafican datos experimentales.
2. Con las columnas 1 y 9, se grafican recta por método de punto bajo y punto alto.

$$P.B. = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 15.6$$

$$P.A. = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 27.7$$



Gráfica 5. Curva de Referencia de Cefalotina

Cepa de prueba Bacillus subtilis

Línea de datos experimentales - - - - -

Línea de datos corregidos _____

Lectura de los valores de las Curvas de Referencia y correcciones

ANTIMICROBIANO: Dicloxacilina

Fase Experimental A

TABLA No. 10

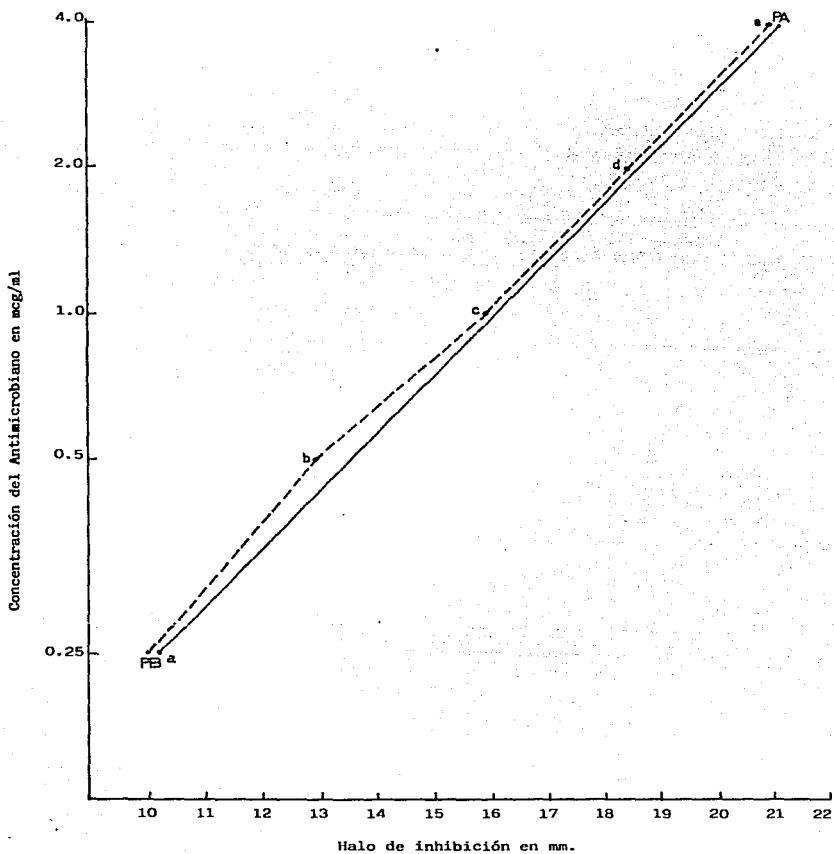
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y conc.	X ₁ mm.	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	\bar{X}
0.25	9.1	11.6	9.4	10.8	9.5	8.8	11.0	10.0
0.5	11.5	15.2	12.1	13.1	12.1	11.8	14.3	12.9
1.0	14.6	17.7	14.7	16.1	15.8	15.0	17.4	15.9
2.0	17.5	21.2	17.1	18.0	17.3	17.3	20.5	18.4
4.0	20.0	24.0	20.1	20.4	19.0	19.5	23.2	20.9

METODO DE PUNTO BAJO Y PUNTO ALTO:

1. Con las columnas 1 y 9, se grafican datos experimentales.
2. Con las columnas 1 y 9, se grafican recta por método de punto bajo y punto alto.

$$P.B. = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 10.2$$

$$P.A. = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 21.1$$



Gráfica 6. Curva de Referencia de Dicloxacilina
 Cepa de prueba Bacillus subtilis
 Línea de datos experimentales - - - - -
 Línea de datos corregidos _____

Lectura de los valores de las Curvas de Referencia y correcciones

ANTIMICROBIANO: Penicilina

Fase Experimental A

TABLA No. 11

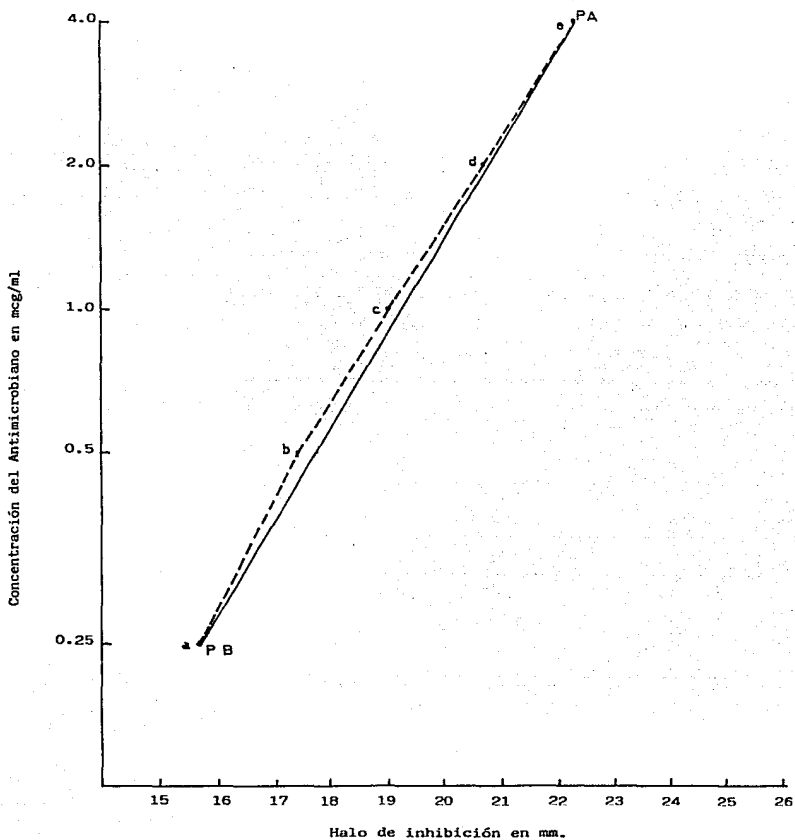
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y conc.	X ₁ mm.	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	\bar{X}
0.25	9.9	10.0	14.4	14.5	18.0	22.3	20.9	15.7
0.5	11.9	11.5	16.4	16.0	19.5	24.0	22.5	17.4
1.0	13.2	12.7	17.3	17.0	21.9	26.0	24.7	19.0
2.0	14.8	14.3	19.0	19.0	23.8	27.6	26.2	20.7
4.0	16.4	15.5	20.6	20.6	26.3	29.0	27.7	22.3

METODO DE PUNTO BAJO Y PUNTO ALTO:

1. Con las columnas 1 y 9, se grafican datos experimentales.
2. Con las columnas 1 y 9, se grafican recta por método de punto bajo y punto alto.

$$P.B. = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 15.7$$

$$P.A. = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 22.3$$



Gráfica 7. Curva de Referencia de Penicilina

Cepa de prueba Bacillus subtilis

Línea de datos experimentales - - - - -

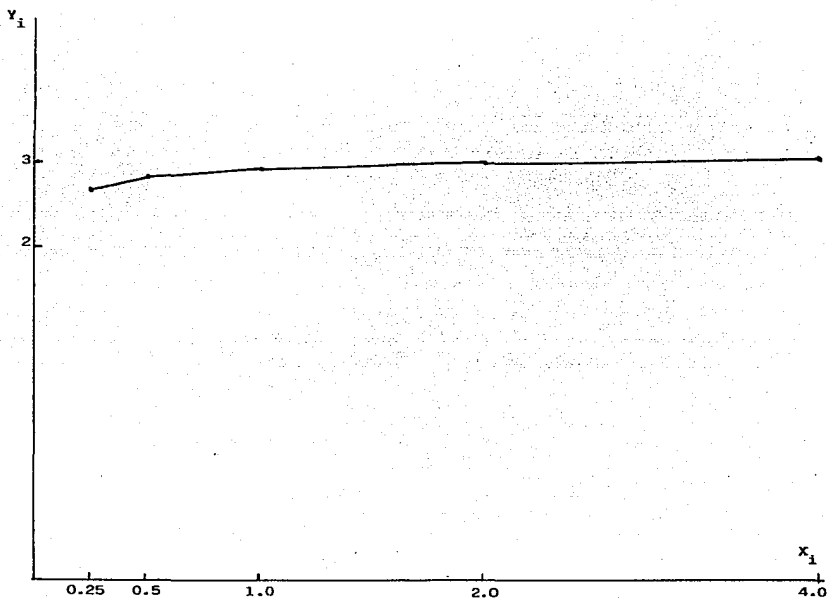
Línea de datos corregidos _____

Método de Mínimos Cuadrados

Antimicrobiano: Ampicilina

Tabla No. 12

i	X_i	Y_i	$X_i Y_i$	X_i^2	$X_i^2 Y_i$	X_i^3	X_i^4	Y_i'
1	0.25	2.67	0.6675	0.0625	0.1669	0.0156	0.0039	2.627
2	0.5	2.80	1.4000	0.25	0.7	0.125	0.0625	2.768
3	1.0	2.91	2.91	1.0	2.91	1.0	1.0	2.885
4	2.0	3.03	6.06	4.04	12.12	8.0	16.0	3.052
5	4.0	3.12	12.48	16.0	49.92	64	256.0	3.122
Σ	7.75	14.53	23.5175	21.3125	65.8169	73.1406	273.0664	



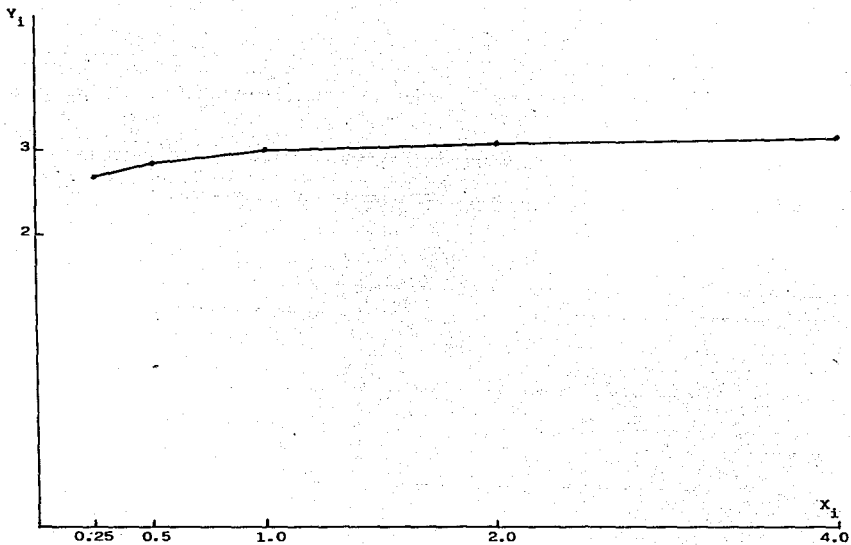
Gráfica 8. Ampicilina
Método de Mínimos Cuadrados

Método de Mínimos Cuadrados

Antimicrobiano: Cefaloridina

Tabla No. 13

i	X_i	Y_i	$X_i Y_i$	X_i^2	$X_i^2 Y_i$	X_i^3	X_i^4	Y_i'
1	0.25	2.69	0.6725	0.0625	0.1681	0.0156	0.0039	2.74
2	0.5	2.86	1.43	0.25	0.715	0.125	0.0625	2.82
3	1.0	3.00	3.0	1.0	3.0	1.0	1.0	2.97
4	2.0	3.14	6.28	4.0	12.56	8.0	16.0	3.17
5	4.0	3.25	13.0	16.0	52.0	64.0	256.0	3.25
Σ	7.75	14.94	24.3825	21.3125	68.4431	73.1406	273.0664	



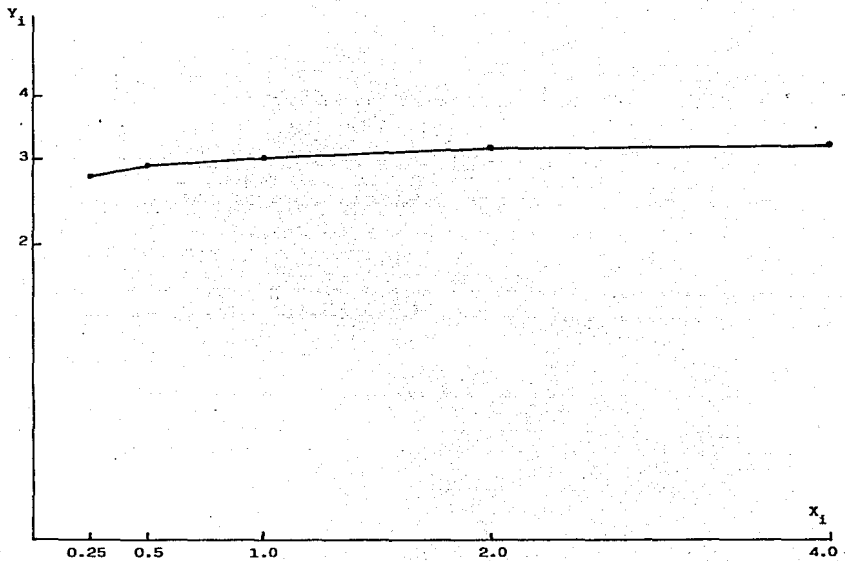
Gráfica 9. Cefaloridina
Método de Mínimos Cuadrados

Método de Mínimos Cuadrados

Antimicrobiano: Cefalotina

Tabla No. 14

i	X_i	Y_i	$X_i Y_i$	X_i^2	$X_i^2 Y_i$	X_i^3	X_i^4	Y_i'
1	0.25	2.77	0.6925	0.0625	0.1731	0.0156	0.0039	2.80
2	0.5	2.91	1.455	0.25	0.7275	0.125	0.0625	2.88
3	1.0	3.06	3.06	1.0	3.06	1.0	1.0	3.03
4	2.0	3.21	6.42	4.0	12.84	8.0	16.0	3.24
5	4.0	3.32	13.28	16.0	53.12	64.0	256.0	3.32
Σ	7.75	15.27	24.9075	21.3125	69.9206	73.1406	273.0664	



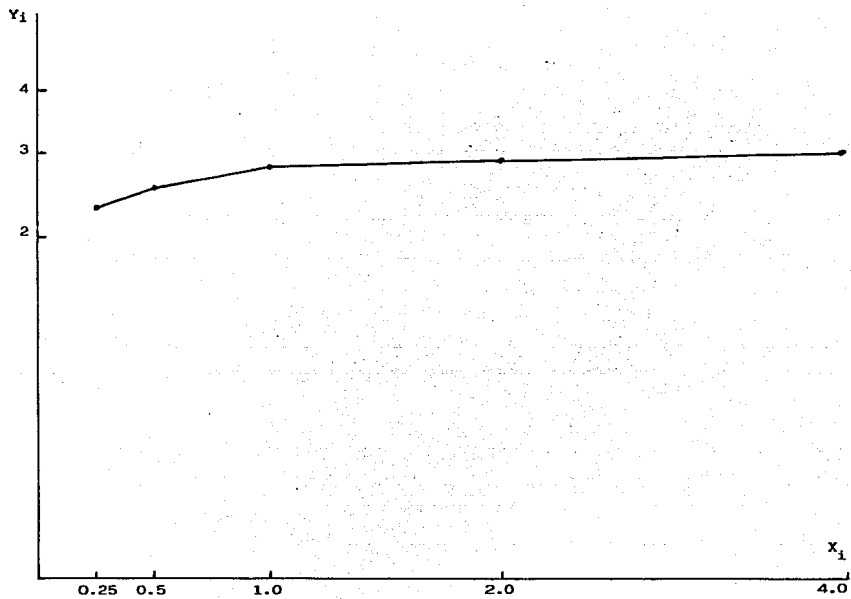
Gráfica 10. Cefalotina
Método de Mínimos Cuadrados

Método de Mínimos Cuadrados

Antimicrobiano: Dicloxacilina

Tabla No. 15

i	X_i	Y_i	$X_i Y_i$	X_i^2	$X_i^2 Y_i$	X_i^3	X_i^4	Y_i
1	0.25	2.30	0.575	0.0625	0.1437	0.0156	0.0039	2.38
2	0.5	2.56	1.28	0.25	0.64	0.125	0.0625	2.50
3	1.0	2.77	2.77	1.0	2.77	1.0	1.0	2.70
4	2.0	2.91	5.82	4.0	11.64	8.0	16.0	2.97
5	4.0	3.04	12.16	16.0	48.64	64.0	256.0	3.03
Σ	7.75	13.58	72.605	21.3125	63.8337	73.1406	273.0664	



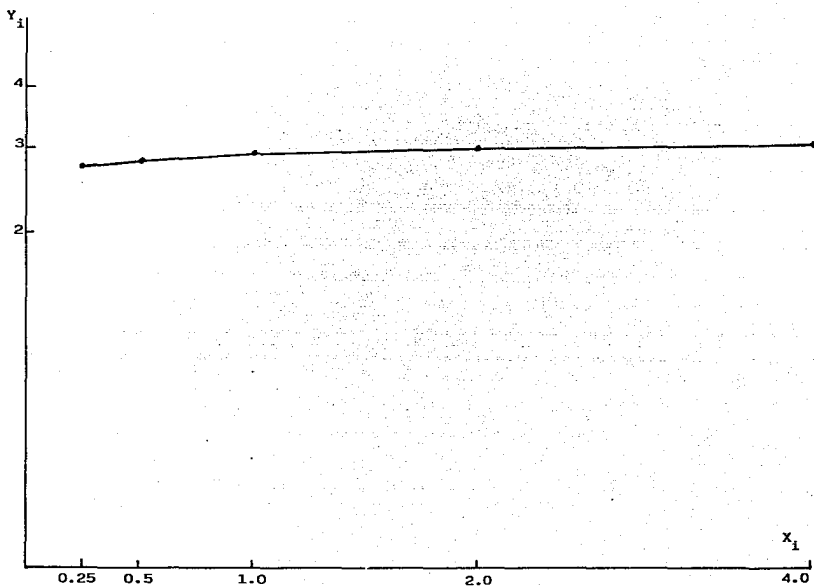
Gráfica 11. Dicloxacilina
Método de Mínimos Cuadrados

Método de Mínimos Cuadrados

Antimicrobiano: Penicilina

Tabla No. 16

i	X_i	Y_i	$X_i Y_i$	X_i^2	$X_i^2 Y_i$	X_i^3	X_i^4	Y_i'
1	0.25	2.75	0.6875	0.0625	0.1719	0.0156	0.0039	2.78
2	0.5	2.86	1.43	0.325	0.715	0.125	0.0625	2.83
3	1.0	2.94	2.94	1.0	2.94	1.0	1.0	2.92
4	2.0	3.03	6.06	4.0	12.12	8.0	16.0	3.05
5	4.0	3.10	12.4	16.0	49.6	64.0	256.0	3.10
Σ	7.75	14.68	23.5175	21.3125	65.5469	73.1406	273.0664	



Gráfica 12. Penicilina
Método de Mínimos Cuadrados

<u>Antimicrobiano</u>	<u>Grados de Confianza</u>
Ampicilina	0.9995
Cefaloridina	0.9995
Cefalotina	0.9995
Dicloxacilina	0.9996
Penicilina	0.9993

B. Segunda fase experimental

Se practicaron siete ensayos a cada uno de los cinco antimicrobianos seleccionados, tanto en su concentración máxima como en la mínima y los valores promedio de la actividad encontrada, así como el porcentaje de la degradación para cada concentración se encuentran en la Tabla 17.

TABLA 17

Actividad Antimicrobiana de Beta Lactámicos Liofilizados

Antimicrobiano	Concentración Máx. (mcg/ml)	\bar{X} Actividad encontrada (mcg/ml)	% de Degradación	Concentración Mín. (mcg/ml)	\bar{X} Actividad encontrada (mcg/ml)	% de Degradación
Ampicilina	5.0	0.53	90	0.5	No detectable	?
Dicloxacilina	5.0	2.43	51.4	0.5	0.14	72
Cefaloridina	30.0	2.76	90.8	0.5	0.37	26
Cefalotina	30.0	3.45	88.5	0.5	0.34	32
*Penicilina	2.0	0.27	86.5	0.5	0.06	88

* = U/ml.

VII. DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos, se puede decir que el método biológico empleado, llamado curva de referencia, es de utilidad para cuantificar la actividad antimicrobiana, siempre y cuando se controlen las variables de estudio para cada prueba experimental, con el diseño adecuado del modelo propuesto.

El fundamento de lo mencionado en el parrafo anterior, se apoya en el largo tiempo de entrenamiento de un equipo numeroso de personal técnico y médico que colaboró en la aplicación correcta de los ensayos experimentales realizados para cada antimicrobiano, así como el manejo del mayor número de muestras que proporcionaron datos suficientes, en cada procedimiento, para tener representatividad estadística.

En este procedimiento biológico, de gran utilidad para la realización de investigaciones farmacológicas, es recomendable emplear estudios estadísticos comparativos, que apoyen la eficiencia y reproducibilidad del sistema.

La adopción del método matemático de mínimos cuadrados, puede apoyar al sistema de ecuaciones de punto alto y punto bajo y la prueba de χ^2 , nos proporcionó los grados de confianza y el buen comportamiento del sistema. Sin embargo en el caso del método de mínimos cuadrados, para obtener su máxima utilidad y beneficio en la aplicación a la investigación de los sistemas biológicos, se requiere de amplios conocimientos matemáticos y estadísticos, lo cual no es común que el profesionista del campo médico biológico los adquiera en su entrenamiento de pregrado, por lo que es recomendable tener asesoramiento del departamento de estadística o preparar al equipo de trabajo responsable de estos ensayos biológi-

cos, para adquirir los conocimientos necesarios.

En la segunda fase experimental, al cuantificar la actividad antimicrobiana, esta se encontró muy disminuida o en algunos casos no se detectó, quizás debido a un mal manejo en el procedimiento de liofilización y a un inadecuado control de calidad de cada uno de los componentes contenidos en los frascos ampúla, por lo que se recomienda tomar en cuenta estas variables para futuras investigaciones.

Es conveniente poner especial atención en el comportamiento de los antimicrobianos del grupo de los beta lactámicos, los que al hidratarse presentan mayores niveles de degradación molecular en más corto tiempo. (22,23,25,26)

Esta pudo ser otra de las probables fallas del procedimiento, ya que el trabajo previo refería, que habían hidratado y mezclado con el caldo nutritivo el antimicrobiano, antes de someterlo al proceso de liofilización, además desconociendo los tiempos transcurridos entre cada procedimiento.

La degradación que presentaron los cinco beta lactámicos; Ampicilina, cefalotina, cefaloridina, dicloxacilina y penicilina, en sus liofilizados que indicaban tener las máximas concentraciones elegidas de antimicrobiano, fue de más del 50%. Esto no es posible afirmarlo en el grupo de las mínimas concentraciones indicadas en el experimento, ya que con el método biológico empleado no se pudo detectar actividad en el caso de Ampicilina, por lo que además se propone diseñar un sistema de curva de referencia para detectar bajas concentraciones de antimicrobiano. (16)

Sería interesante continuar con la tarea de implementar nuevos sistemas de antibiogramas, que superen las desventajas de los conocidos actual

mente y que sean de utilidad como pruebas de susceptibilidad en el laboratorio clínico de rutina, ya que el informe de dichas pruebas, representa un eslabón importante entre el médico y el paciente para enumerar las drogas de elección e instalar el tratamiento correcto.

VIII. CONCLUSIONES

Es necesario la aplicación de un sistema biológico para pruebas de susceptibilidad *in vitro*, que determine el comportamiento de un microorganismo patógeno frente a los antimicrobianos, para obtener información significativa en el establecimiento de una terapéutica racional y resolutiva.

El manejo técnico de los elementos de los sistemas empleados en ambas fases experimentales es sencillo, fácil y aunque de costo moderado, accesible a cualquier centro de investigación microbiológica y cuyo valor máximo es el de servir como control de calidad.

El método de punto alto y punto bajo, es prácticamente el más utilizado en la investigación farmacológica, ya que tiene validez estadística, además de sencillez en la elaboración de la gráfica, que no requiere de conocimientos matemáticos profundos para obtenerla.

El método de mínimos cuadrados es más preciso que el anterior debido a un mayor grado de confiabilidad, pero también requiere de una compleja elaboración matemática, sin embargo para su aplicación es necesaria la preparación matemática de las personas que realicen los experimentos.

El método de X^2 confirma la confiabilidad del sistema de curva de referencia y la validez del análisis estadístico de los dos métodos ya mencionados.

El método biológico empleado, cumplió las funciones para el objetivo marcado y es reproducible y estadísticamente significativo.

La liofilización del material biológico para pruebas de susceptibilidad *in vitro*, en este caso no reunió la característica deseada (actividad antimicrobiana), requisito indispensable para aplicarse como prueba

de susceptibilidad (antibiograma) en el laboratorio de rutina del medio hospitalario.

IX. RESUMEN

En la primera fase experimental se hace la descripción de un método biológico (curva de referencia), que sea válido para determinar la actividad antimicrobiana, presente en muestras problema de material liofilizado (medio de cultivo nutritivo para bacterias y antimicrobiano del grupo de los beta lactámicos en concentraciones conocidas. El método utiliza un medio de cultivo sólido inoculado con un germen de susceptibilidad probada y cantidades conocidas, seleccionadas para cada uno de los siguientes antimicrobianos: Ampicilina, cefaloridina, cefalotina, dicloxacilina y penicilina.

Se comprobó la reproducibilidad del sistema, aplicando el concepto estadístico que se refiere al mínimo número de muestra representativa, preparando en este caso siete curvas de referencia para cada fármaco, sometiendo los datos experimentales al análisis estadístico. Para ello se emplearon los métodos de punto bajo y punto alto, método de mínimos cuadrados y banderas de dispersión, así como la prueba de X^2 demostrándose la validez y confiabilidad del procedimiento biológico para los objetivos propuestos.

Apoyándose en la fase anterior, en la segunda fase experimental, se construyeron curvas de referencia para cada antimicrobiano mencionado, en las cuales se hicieron las lecturas de las muestras problema del material liofilizado, el cual contenía dos concentraciones; una máxima y una mínima, en relación a la mayor y menor concentración de la droga, alcanzada en sangre, posterior a la administración de una dosis terapéutica.

Se determinó la actividad o la degradación que se presentó en cada antimicrobiano probado, encontrando un elevado porcentaje de la inactiva

ción de las drogas, por lo cual este método de antibiograma de dilución en tubo modificado, no reunió las características adecuadas para aplicarlo como prueba de susceptibilidad bacteriana, en la rutina del laboratorio clínico.

X. ANEXO A

Previo identificación y verificación de la pureza del Bacillus subtilis, se inocularon con concentrado bacteriano, dos cajas de petri con medio nutritivo (Antibiotic Medium No. 1 Difco), manteniéndolas a 37°C durante 24 horas.

Al cultivo de las cajas de petri se le aplicaron 10 ml. de solución salina esterilizada, procurando recoger la mayor cantidad de células posibles preparándose una suspensión bacteriana, que se repartió uniformemente en la superficie del medio de cultivo de las botellas de Roux, con 300 ml. del mismo medio de cultivo.

Las botellas se mantuvieron a 37°C durante una semana para inducir la esporulación. El cultivo se cosechó de las botellas de Roux con 30 ml. de agua destilada esterilizada, pasando la suspensión a tubos con tapón de rosca esterilizados; estos se colocaron en un baño de agua a temperatura de 65°C durante 30 minutos, se centrifugaron a 3000 rpm. durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se le agregó nuevamente, agua esterilizada; los tubos se agitaron y se colocaron nuevamente a 65°C el proceso de calentamiento y de lavado se hizo tres veces y después solamente se centrifugó y eliminó el sobrenadante, restituyendo el agua las veces que fuera necesario, hasta observar que quedara completamente limpio. Obteniendo el concentrado de esporas, se conservó en refrigeración a temperatura de 4 - 8°C para su uso posterior.

ANEXO B Estadística

La estadística es una herramienta que puede ayudar a planear la obtención de información sobre ciertos fenómenos, a sistematizarla y anali

zarla, así como hacer inferencias y obtener conclusiones sobre los fenómenos.

Para utilizar la herramienta estadística es indispensable poder calificar los objetos de nuestro estudio en distintas categorías con respecto a las características de interés, permitiéndonos hacer una medición de estas características.

Interpolación de Datos.

Una vez obtenidos los datos experimentales es necesario saber cual es la relación funcional matemática que existe entre ellos. Para ello se recurre a los criterios de interpolación de datos. En forma general ellos son:

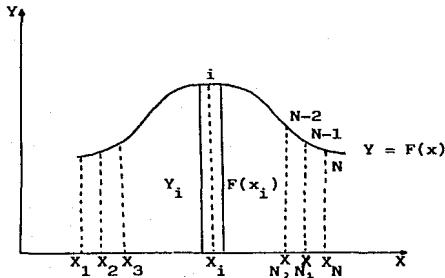
Dada una función f que toma valores reales, definida en $I = [a, b]$, se puede determinar un polinomio de grado $\leq \eta$ que interpola a f en los puntos X_i , $i = 0, 1, \dots, \eta$ con $X_i \in I$ es decir, se considera que la forma funcional es un polinomio de grado η , ésto es $\rho(X_i) = f(x_i), i=0,1,2,\dots,\eta$ por lo que, $F(x)$ se puede expresar como:

$$1.a) F(x) = C_1 \phi_1(x) + C_2 \phi_2(x) + \dots + C_{k-1} \phi_{k-1}(x) + C_k \phi_k(x)$$

ó

$$1.b.) F(x) = \sum_{j=1}^k C_j \phi_j(x) \text{ para } \phi_j(x), j = 1, \dots, k \text{ dadas}$$

Se puede representar este criterio de interpolación mediante la siguiente gráfica:



Ahora bien, en los datos experimentales se encuentra que están relacionados mediante la siguiente expresión:

$$2) \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{2}{x}$$

donde: x Concentración de antimicrobiano en mcg/ml.

Δx Diferencia entre los valores de concentración consecutiva

Δy Diferencia entre los valores de antimicrobiano en milímetros.

lo cual nos conduce a la expresión funcional matemática de los datos experimentales que es:

$$3.a) F(x) = y = e^{x^2} + C$$

ó

$$3.b) F(x) = \ln y = X^2 + C$$

De esta forma obtenemos que la gráfica de esta ecuación debe ser una parábola, cuya expresión general es:

$$4) F(x) = C_1 + C_2X + C_3X^2$$

Método de Mínimos Cuadrados.

Si la característica de un fenómeno se evalúa mediante métodos experimentales es muy factible que los valores obtenidos estén afectados por los diversos factores (variables) que alteran las condiciones en que se desarrolla un experimento, es decir, que existan errores en las mediciones por lo cual se requiere de métodos matemáticos que nos ayuden a eliminar la influencia, que tales errores, ejerzan en los resultados.

Uno de esos métodos matemáticos, es conocido con el nombre de Método de Mínimos Cuadrados; consiste en encontrar los valores teóricos de las constantes C_1 , C_2 , C_3 de la ecuación (6) tomando en consideración todos

y cada uno de los valores de las variables consideradas.

Para ello se debe de resolver el sistema de ecuaciones siguiente:

$$N C_1 + \left(\sum_{i=1}^N X_i \right) C_2 + \left(\sum_{i=1}^N X_i^2 \right) C_3 = \sum_{i=1}^N y_i$$

$$5.a.) \left(\sum_{i=1}^N X_i \right) C_1 + \left(\sum_{i=1}^N X_i^2 \right) C_2 + \left(\sum_{i=1}^N X_i^3 \right) C_3 = \sum_{i=1}^N X_i y_i$$

$$\left(\sum_{i=1}^N X_i^2 \right) C_1 + \left(\sum_{i=1}^N X_i^3 \right) C_2 + \left(\sum_{i=1}^N X_i^4 \right) C_3 = \sum_{i=1}^N X_i^2 y_i$$

donde, en este sistema de ecuaciones se está sustituyendo, $L_n y_i$ por y_i para facilitar su expresión.

La solución del sistema de ecuaciones anterior puede realizarse por varios métodos, por ejemplo el Método de Sustitución, el de Igualación, el de Reducción, el de Determinantes, etc., sin embargo, por cualquiera de estos métodos se obtiene que los valores de las constantes C_1 , C_2 y C_3 son respectivamente:

$$5.b.) C_1 = \frac{1}{\Delta} \left\{ \sum_{i=1}^N y_i [(\sum_{i=1}^N X_i^2)(\sum_{i=1}^N X_i^4) - (\sum_{i=1}^N X_i^3)(\sum_{i=1}^N X_i^3)] - \sum_{i=1}^N X_i y_i [(\sum_{i=1}^N X_i)(\sum_{i=1}^N X_i^4) - (\sum_{i=1}^N X_i^3)(\sum_{i=1}^N X_i^2)] \right\}$$

$$5.c.) C_2 = \frac{1}{\Delta} \left\{ N [(\sum_{i=1}^N X_i y_i)(\sum_{i=1}^N X_i^4) - (\sum_{i=1}^N X_i^2 y_i)(\sum_{i=1}^N X_i^3)] - \right.$$

$$\left. \sum_{i=1}^N X_i [(\sum_{i=1}^N y_i)(\sum_{i=1}^N X_i^4) - (\sum_{i=1}^N X_i^2 y_i)(\sum_{i=1}^N X_i^2)] + \sum_{i=1}^N X_i^2 [(\sum_{i=1}^N y_i)(\sum_{i=1}^N X_i^3) - (\sum_{i=1}^N X_i y_i)(\sum_{i=1}^N X_i^2)] \right\}$$

$$5.d.) \quad C_3 = \frac{1}{\Delta} \left\{ N[(\epsilon_{X_1}^2)(\epsilon_{X_1}^2 y_1) - (\epsilon_{X_1}^3)(\epsilon_{X_1} y_1)] - \right. \\ \left. \epsilon_{X_1} [(\epsilon_{X_1})(\epsilon_{X_1}^2 y_1) - (\epsilon_{X_1}^3)(\epsilon_{y_1})] + \epsilon_{X_1}^2 [(\epsilon_{X_1})(\epsilon_{X_1} y_1) - (\epsilon_{X_1}^2)(\epsilon_{y_1})] \right\}$$

donde el significado de:

$$5.e.) \quad \Delta = N [(\epsilon_{X_1}^2)(\epsilon_{X_1}^4) - (\epsilon_{X_1}^3)(\epsilon_{X_1}^3)] - \epsilon_{X_1} [(\epsilon_{X_1})(\epsilon_{X_1}^4) - (\epsilon_{X_1}^3)(\epsilon_{X_1}^2)] + \\ (\epsilon_{X_1}^2) [(\epsilon_{X_1})(\epsilon_{X_1}^3) - (\epsilon_{X_1}^2)(\epsilon_{X_1}^2)]$$

Una vez que conocemos los valores de las constantes C_1 , C_2 y C_3 , los sustituimos por cada valor de X_i encontrado para determinar el valor de y_i correspondiente en la fórmula siguiente:

$$6) \quad y_i = C_1 + C_2 x_i + C_3 x_i^2$$

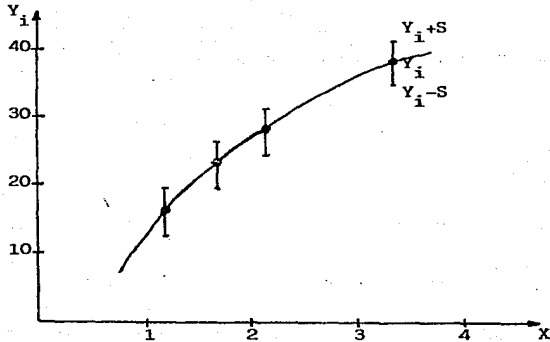
Al graficar los valores de x y y , encontramos una parábola, que se dice está ajustada teóricamente.

Banderas de Dispersión

A menudo en los experimentos ocurre que las condiciones en que se realizan, suelen ser distintas de las teóricamente planteadas o bien que el conjunto de errores introducidos en el mismo durante su desarrollo, como los procedimientos de medición, fallas de los aparatos empleados, etc. provoquen que, a pesar de un ajuste teórico de los valores obtenidos mediante métodos, como el de Mínimos Cuadrados, no se encuentren dentro de la curva teórica obtenida. Este comportamiento se debe considerar desde el punto de vista estadístico, el cual nos dice que los valores obtenidos en la ecuación de una variable tienen una distribución aleatoria y por lo tanto debemos tomar en cuenta el grado de dispersión en que se encuentran dichos valores.

Esto se puede realizar considerando que cada y_i obtenida se encuentra dentro del intervalo $(y_i - s, y_i + s)$, el cual nos permite determinar con un grado de certeza elevado, las variaciones que pueden tener los valores desde el punto de vista estadístico. Y a la longitud del intervalo de variación de cada y_i se le denomina Bandera de Dispersión.

Lo anterior se puede representar gráficamente en la siguiente figura:



XI. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, T.G., and Troyanosky. 1960. Antibiotic testing by the disk method. Antibioti. Annu. 1959-1960; 587-596.
2. Balows A. Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. 1976 Editorial médica panamericana, S. A. Buenos Aires, Argentina
3. Bergey, D.H., (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. ed. The William and Wilkins Co. Baltimore, Md. USA.
4. Bauer, A.W., et. al. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol. 45: 492-496.
5. Bennet, J. V., J. L. Brodie, E. J. Benner, and W.H. Kirby. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl. Microbiol. 14: 170-177.
6. Cassady, G. 1966. Plasma volume studies in low birthweight infants. Pediatr. 38: 1017-1027.
7. Bowman y Rand. 1984. Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. 2a. Edición, Editorial Interamericana, México.
8. Calero, J. del R. (1977) Microbiología e Inmunología de las Enfermedades Infecciosas. Ed. Marban. Madrid España
9. Davidshon, I. and K. S. Bernard (1975) Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Barcelona, España.
10. Davis, B.D., R. Dubelcco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, W. B. Wood, Jr. 1978. Tratado de Microbiología 2a. ed., Editorial Salvat; México D.F.
11. Davies, W.W., and T. R. Stant. 1971. Disk plate method of Microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. Appl. Microbiol. 22: 659-665.
12. Dixon, W.J., Massey, 1969. Introduction to Statistical Analysis.

- Third Edition. Mc Graw-Hill Book Co. N. York.
13. Dubos, R.S. and J. G. Hirsch (1965) Bacterial and mycotic infection of man. 4a. J.B. Lippincott, Co.
 14. Dubos, R., Schaedler, R.W. Litchefield, and Stephens, M. 1963. Chapter IV. Methods in Microbiology. Editors. J.R. Norris. and D.W. Ribbons. Vol 7 A. Academic Press. New York 1970. F.exp. Med. 117-231
 15. Ericsson, H. M., and J.C. Sherris 1971. Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. Acta.Pathol. Microbiol. Scand. (Suppl. B.) 217 61-65.
 16. Esquivel H.C., Herrera S.C., 1977. Prueba de un micrométodo para cuantificar un antimicrobiano en muestras muy pequeñas de Plasma y líquido cefalorraquídeo de niños recién nacidos. Tesis Profesional UNAM. Facultad de Ciencias México, D.F.
 17. Escárzaga. T.E. J.M. Hill (1971) Determinacion de la actividad antimicrobiana presente en los discos para antibiograma. Tribuna Médica XXIII, No. 9, pp. A7 - A 11, Nov. 1972.
 18. Escárzaga T. E. y Col. (1969) La prescripción de los antimicrobianos en la práctica médica. Rev. Méd. Méx. 34: 5-7.
 19. Escárzaga. T.E., B.P. Crevenna; D.S. González (1966) Susceptibilidad de los gérmenes enteropatógenos frente a los antibióticos. Rev. Med. Méx. Tomo XLVI. No. 985,
 20. Flores, F.M. y C.A. Fernández. 1977, Combinaciones de los antimicrobianos, (2a. parte). Invest. Méd. Int. 4: 593-600,
 21. Flores, F.M. y C.A. Fernández. (1977) Combinaciones de los antimicrobianos, (2a. parte). Invest. Méd. Int. 4: 593-600.
 22. Gale, E.F., et al. 1972. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley and Sons. London 456.
 23. Garrod, L.P., H.P. Lambert, and F. O'Grady. 1973. Antibiotic and Chemotherapy. Fourth ed. Churchill Livingstone. Edimburgh: 546.
 24. Gavan. T.L., H. W. McFadden Jrs., and EL.L. Cheattle. 1971. Antimicrobial susceptibility testing. American Society of Clinical Pathologist. Inc. Chicago Illinois: 244.
 25. Goodman, L.S., y A. Gilmen. 1974. Bases Farmacológicas de la terapéutica. 4a. ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México.
 26. Goth, A. 1973. Farmacología Médica 6a. ed. Nueva Editorial Interamericana, México.

27. Grove, D.C. and Randall. 1955. Assay Methods of Antibiotics; a laboratory manual. Medical Encyclopedia, Inc. N. York.
28. Hammond S. M. and Lambert P.A. 1978. Antibiotics and Antimicrobial Action. 1a. ed. The Camelot Press Ltd., Southapton. London.
29. Hill, J.B. Principios de Estadística Médica. 3a. ed. El ateneo, Buenos Aires, Argentina.
30. Horta, S.C., Luna, C.M. Antibiograma genérico 1976, Rev. Méd. Hosp. Gral. (Méx). Vol. 40 No. 8: 501, 511, 1977.
31. Ipsen, J., Feigl, P., Bancroft's Introduction to Bioestadistics. Second ed. A. Harper International Edition. 185-189.
32. Kisch, A. L. and Bartholomew, L. (1976) Comparison of the "invitro" Activity of several cephalosporin antibiotics against Gram-negative and Gram-positive bacteria resistant to Cephasloridine. Antimicrob. Ag. Chemother. 10: 507-510.
33. Lapage, S.P. and Shelton, T.E. Chapter II. Culture collection and the preservation of bacteria. Methods in Microbiology. Editors. Norris, J. R. and Ribbons, D.W. Vol. 3 Academic Press. New York 1970: 136-200.
34. Lennette, E.H. Spaulding. E.H. and Truant, J.P. 1974. Manual of Clinical Microbiology. 2a. ed. por E.H. Lennete ASM Washington D.C. USA.
35. Litter, M . 1975 Farmacología Esperimental y Clinica, 5a. ed. "El Ateneo" Buenos Aires, Argentina.
36. Meyers, F.H., Jawetz, E. and Golfien, A. 1965. Review of medical pharmacology. Lange. Medical Publications. California: 692-696.
38. Norris, J.R. and Ribbons, D.W. Chapter I, Methods in Microbiology Vol. 8. Academic Press. London and N. York. 1973: 36-57.
39. Pagola, J.G. 1973. Manejo Práctico de los Antimicrobianos 3a. ed. México.
40. Pratt, W.B., 1973. Fundamentals of Chemotherapy. Oxford University Press. New York.
41. Rey, L. 1964 Aspects Théoretiques et Industriels de la Lyophilisation. Hermann, Paris.
42. Simon, H.J. and Yin, E.J. 1970. Microbioassay of antimicrobial agents. Appl. Microbiol. 19: 573-579.

43. Snow G. A. and Franklin T. J., 1971. Biochemistry of Antimicrobial Action. First published. Great Britain.
44. Spooner, D.F. and Sykes, G., 1972. Laboratory Assessment Antibacterial Activity. The Boots Company Ltd., Nottingham, England.
45. Szybalski, W., Bryson, V., 1952. Antibiotic sensitivity testing, In Methods in Microbiology. Editors. J. R. Norris and D. W. Ribbons. Vol. 7-B. Academic Press. New York. 464-489.
46. Steers, E. Foltz, E. L. Graves, B. S. and Riden, J. 1967. An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiotics and Chemother, 9: 307-311.
47. Taro Yamane. 1979, Estadística Ed. Harla México.
48. Thomas G.L. and Mc Fadden H. W., 1971. Antimicrobial Susceptibility testing. Ed. U.A.A. 41-43
49. Topiwala, H.H. Chapter IV. Mathematical Models in Microbiology. Editors. J. R. Norris and D. W. Ribbons. Vol. 7-B Academic Press. New York. 1972.
50. Waitz, J.S. 1973. Interrelationship between disk and tube dilution sensivity test forbaminoglycoside antibiotics. Antimicrob. Ag. Chemother. 4: 445-454.
51. Wilkins, T.D., Holdeman, L.B., Abramson, I.J., Moore, W.E., 1972. A Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrob. Ag. Chemother, 1: 415-419.