

15.306627  
dej



# UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

## ESTANDARIZACION DE UN METODO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE NUEVE ANTIMICROBIANOS EN DISCOS DE PAPEL FILTRO

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
EMMA GUADALUPE HERRERA ORTEGA



## **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.

## CAPITULACION

	PAG
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
I GENERALIDADES	
EMPLEO DE ANTIMICROBIANOS EN EL TRATA- MIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS	4
ORIGEN DE LOS ANTIMICROBIANOS	4
GRUPOS PRINCIPALES DE ANTIMICROBIANOS	6
IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS DE SENSIBI- LIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	19
METODOS PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE DISCOS	21
TECNICA DE BAUER - KIRBY	23
TECNICA DESCRITA EN LA FARMACOPEA	25
II PARTE EXPERIMENTAL	27
III RESULTADOS Y ANALISIS	34
IV CONCLUSIONES	60
V ANEXO	61
VI BIBLIOGRAFIA	70

## INTRODUCCION

La selección de un antimicrobiano para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, con frecuencia está supeditado al conocimiento de la susceptibilidad del microorganismo infectante, misma que habitualmente es factible determinar mediante pruebas in vitro

Cuando ésta se estandariza de manera adecuada, sus resultados suelen ser congruentes en la respuesta al tratamiento que se observa en la práctica clínica (68).

Las pruebas de susceptibilidad in vitro, miden la capacidad de un antimicrobiano para inhibir el desarrollo bacteriano.

Estas pruebas se pueden hacer por procedimientos de difusión o de dilución, sin embargo, se prefiere hacer uso de los procedimientos de difusión de discos y no de los de dilución para uso rutinario, ya que son los más sencillos y además que se pueden practicar con rapidez.

Para que se obtengan resultados fidedignos, útiles para la selección de agentes terapéuticos, es necesario que los procedimientos que se empleen, se encuentren estandarizados de manera adecuada, es por ello, que la Food and - Drug Administration en los Estados Unidos, publicó un Reglamento, mismo que se basó en la técnica de Bauer y colaboradores (6).

En México, la Farmacopea se basa en lo anterior, en ella se indica que las pruebas de potencia de discos impregnados con antimicrobianos, deben efectuarse realizando curvas de calibración, en las que se miden el diámetro de inhibición obtenido al poner en contacto una suspensión de bacterias con cinco diferentes concentraciones del antimicrobiano.

Este trabajo servirá esencialmente en el Laboratorio de Control de Calidad de Bigaux Diagnostica, en virtud de la necesidad de contar con un método re

producible y eficaz que proporcione información fidedigna y sirva de apoyo en la certificación del contenido antimicrobiano por disco. Sin embargo, también puede tener aplicación práctica en otras situaciones ; como son:

a).- En los Laboratorios de Instituciones Hospitalarias o de Análisis - Clínicos que efectúen Control de Calidad, ya que se les permitirá disponer de una metodología sencilla, que requiere material y cepas de uso diario, para asegurarse de la potencia de los discos que reciben del proveedor. Debido a que, dadas las condiciones del medio, en ocasiones un almacenamiento deficiente, provoca variaciones importantes en la potencia de los discos que inicialmente era adecuada.

b).- Al investigar concentración de antimicrobianos, previamente administrados en diferentes fluidos corporales (suero, líquido céfalo - raquídeo, orina).

## OBJETIVOS

Establecer las condiciones para simplificar las pruebas de potencia de discos de papel filtro impregnados con distintos antimicrobianos.

Proponer la metodología adecuada para establecer en base a ésta , valores similares de contenido por disco a los establecidos con la técnica de referencia.

Establecer la correlación existente entre la técnica de referencia y la técnica de siembra en superficie para diferentes lotes de antimicrobianos.

Comparar los resultados que se obtienen al calcular por un método gráfico y uno matemático, el contenido por disco de los antimicrobianos a evaluar.

Establecer líneas de regresión para cada antimicrobiano, de una manera más sencilla y económica que siguiendo la técnica de la Farmacopea.

## CAPITULO I GENERALIDADES

### EMPLEO DE ANTIMICROBIANOS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las posibilidades de influir favorablemente sobre la evolución de las enfermedades infecciosas, eran prácticamente nulas antes del conocimiento de la etiología microbiana; y es a partir de 1878 con Koch y Pasteur (15) que se dan los primeros pasos para el control de las infecciones (17). Se descubrieron y aislaron compuestos como la quinina y la emetina y se desarrollaron productos sintéticos como los arsenicales orgánicos y las aminoquinoleínas. A pesar de estos avances, y de las contribuciones de las vacunas y sueros antitóxicos, permanecieron altas las tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas como neumonía, tuberculosis, rickettsiasis, meningitis, enfermedades de transmisión sexual, septicemias por bacterias gram positivas, gram negativas, fiebre tifoidea, estreptococcias, endocarditis, etc., ya que a pesar de conocer los agentes etiológicos, no se alcanzaban a cubrir las necesidades terapéuticas (34).

#### ORIGEN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Es en base a esta preocupación que se funda el Instituto Pasteur (París), así como una larga serie de Instituciones similares en todo el mundo (58), en los que se realizaron una serie de investigaciones que tenían como objetivo encontrar la forma de curar las enfermedades infecciosas. Es así, que en 1877, Pasteur y Joubert reconocen la posibilidad de utilizar algunos organismos, especialmente las bacterias, en la terapéutica de las infecciones (58). En 1881 Tyndall descubrió que con utilizar un hongo del género Penicillium se aclaraban soluciones enturbiadas por el crecimiento bacteriano (17). En 1900 se descubre un precursor de antibiótico relativamente puro llamado plocianina (17). En 1904 Ehrlich buscó sustancias quí-

micas específicas que pudieran presentar mayor actividad frente a los parásitos que frente a las células del huésped e introduce el término quimioterapia. (17).

En 1929, Fleming describe la acción del hongo Penicillium rubrum sobre el estafilococo dorado. En 1935, Domagk descubrió un colorante, inactivo in vitro, que curaba infecciones por estreptococos, al cual le dió el nombre de Prontosil (17). En 1936, Tréfouel, encontró que a los pacientes a los que se les aplicaba el colorante, eliminaba por la orina un producto incoloro, la sulfamilamida, activo in vitro.

Este compuesto pronto fue sustituido por derivados más activos que en conjunto se les conoce como sulfonamidas. (84)

En 1939, Thom, clasificó correctamente el hongo descrito por Fleming como Penicillium notatum (58). En 1944, Waskman descubrió la estreptomycinina (producida por Streptomyces griseus), sin embargo, fue el hongo descrito por Fleming el que empleó a gran escala debido a su mayor efectividad comparada con los otros antimicrobianos entonces disponibles: estreptomycinina y sulfonamidas (58, 84).

Es conveniente aclarar el significado de tres términos que se emplearán a lo largo de la presente investigación: Antimicrobiano, antibiótico y quimioterápico. El término antimicrobiano se refiere a cualquier sustancia con capacidad de actuar sobre un grupo más o menos amplio de microorganismos; por tanto, incluye a los antibióticos y a los quimioterápicos. Un antibiótico es toda aquella sustancia producida por el metabolismo de microorganismos que tienen, a bajas concentraciones, acción inhibitoria contra microorganismos y en ocasiones afectan también células animales (25, 46). Por último, un quimioterápico es toda aquella sustancia sintetizada químicamente, que puede interferir directamente con la prolifera-

ración de los microorganismos a concentraciones toleradas por el huésped. (63)

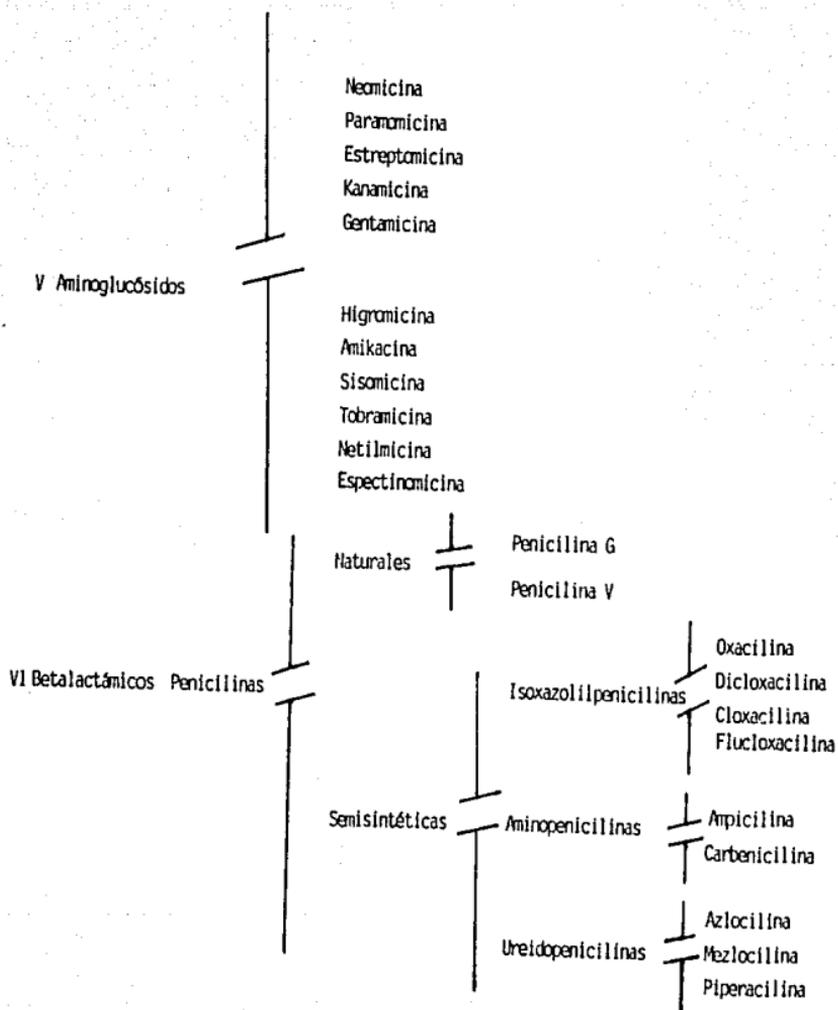
La característica fundamental de los antimicrobianos es la toxicidad selectiva y representan el campo más importante de la especialización farmacéutica, pueden clasificarse en base a su origen o eficacia, a su biosíntesis o modo de acción; sin embargo, la clasificación que más se emplea está basada en su estructura química, como se observa en la tabla #1 (32, 69).

#### GRUPOS PRINCIPALES DE ANTIMICROBIANOS.

TABLA # 1

Clasificación de los antibióticos en base a su estructura química (32, 69)

I Rifamicinas		Rifamicina SV
		Rifamidas
II Misceláneos		Cloramfenicol
		Polimixinas
		Vancomicina
III Tetraciclina		
IV Macrólidos		Eritromicina
		Novomiocina
		Clindamicina
		Lincomicina



VI BETA LACTAMICOS	Cefalosporinas	Cefaloridina	Cefuxitina
		Cefalotina	Cefaclor
		Cefazolidina	Moxalactam
		Cefapirina	Cefotaxima
		Cefacetrilo	Cefoperazona
		Cefalexina	Cefsulodin
		Cefadrina	Ceftizocima
		Ceftazidima	Ceftrixona
			Cefmenoxima

A continuación se mencionarán las características más sobresalientes de cada uno de los grupos de antibióticos.

Las rifamicinas fueron aisladas por Sensi en 1959 y a partir de Streptomyces mediterranei. Su estructura básica es la de un compuesto anular cromático sobre el que se extiende un puente alifático, constituyen una mezcla de 5 fracciones (A, B, C, D y E), de las cuales la fracción B es la más activa. (66).

Para su difusión se unen a las proteínas del plasma y actúan interfiriendo con gran especificidad sobre las enzimas bacterianas y algunos virus que están involucrados en la biosíntesis de polinucleótidos. A pesar de presentar gran actividad contra cocos gram positivos, Neisseria, H. influenzae, Mycobacterium tuberculosis y M. leprae no son

fármacos de elección en procesos comunes de patología infecciosa (1).

De este antibiótico se derivan dos compuestos: Rifamicina SV y Rifamida (10, 49).

El cloramfenicol fue aislado en 1947 a partir de Streptomyces venezuelae. Está constituido por un anillo bencénico, con un grupo -- p-nitrobenceno y una cadena lateral que por tener 2 carbonos asimétricos permite la existencia de 4 isómeros de los cuales sólo uno de ellos, el d(treo) levógiro, es el activo. (43).

En bacterias sensibles, se une estereoespecíficamente a la subunidad 50 s de los ribosomas 70 s, bloqueando la actividad de la enzima - peptidiltransferasa, con lo que se detiene la síntesis de proteínas(40,84)

Por su gran empleo, se han creado diversos métodos para cuantificar su concentración en los diversos fluidos orgánicos. (3, 75).

Los antibióticos de naturaleza polipeptídica fueron aislados en 1947 a partir de Bacillus polymyxa, presentan estructura cíclica que contiene aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos; son deca péptidos cíclicos, catiónicos, que contienen aminoácidos de las variedades d( - ) y l( - ) (46).

Las Polimixinas constituyen el grupo más numeroso de estos compuestos, de las cuales sólo se usan clínicamente las polimixinas B y E - (74). Ejercen su acción por el carácter anfipático de sus aminoácidos - que distorsionan la membrana celular y se comportan como detergentes - catiónicos (28).

Otro antibiótico es la vancomicina, ésta se obtiene a partir de Streptomyces orientalis, su estructura química se desconoce, únicamente se sabe que contiene aminoácidos (18), su acción está dirigida contra bacterias gram positivas, hecho opuesto de lo que sucede con las polimi-

xinas .

En otro grupo de antibióticos tenemos a las tetraciclinas, son compuestos policíclicos, su anillo básico es el naftaceno en donde la substitución en las posiciones C-5, C-6, y C-7, establecen las diferencias entre las tetraciclinas conocidas (62): Clortetraciclina, oxitetraciclina (corta acción) y metaciclina, desmetiltetraciclina, minaciclina (larga acción).

Las cepas resistentes a las tetraciclinas, son capaces de inhibir el transporte del antibiótico a su sitio de acción en el citoplasma bacteriano, e incluso efectuar transporte activo al exterior de la bacteria (62).

Los antibióticos denominados macrólidos son producidos por especies de Streptomyces y se caracterizan por un anillo lactónico macrocíclico al cual se le adicionan azúcares especiales.

Se clasifican con base al tamaño del anillo. En esta clasificación se encuentran más de 40 miembros, los cuales inhiben a muchas bacterias gram positivas y algunas gram negativas. Los principales representantes de este grupo son la eritromicina, lincomicina y clindamicina.

La eritromicina fue aislada en 1951 a partir de Streptomyces erythraeus. Su molécula contiene dos azúcares: desosamina y clidínosa- (34).

Presenta acción bactericida - bacteriostática. Se le puede encontrar formando diferentes sales, de las cuales la que se absorbe con mayor facilidad es el estolato (57). Además de presentar actividad sobre los microorganismos incluidos en el espectro de la penicilina natural, es el antibiótico de elección en enfermedades causadas por Bordetella pertussis, Mycoplasma pneumoniae, Legionella pneumophila y Campylobacter fetus. (41).

La lincomicina fue aislada en 1962 a partir de Streptomyces lincolnensis, es el resultado de la fusión de un aminoácido y un azúcar aminado. Modificando ligeramente su estructura se obtuvo la clindamicina, la cual tiene una acción extraordinaria en contra de los microorganismos anaerobios. Considerando su estructura química, ambos compuestos no forman parte estricta de los macrólidos. Presentan un espectro antimicrobiano semejante a la penicilina natural y a la eritromicina.

Los antibióticos llamados aminoglucósidos poseen rápida acción bactericida, la cual obedece a su poder de penetración, ya que atraviesan la membrana celular e inhiben la síntesis protéica (38, 61), de acuerdo con el tipo de aminoglucósido de que se trate, varían las posiciones de los grupos hidroxilo y amino. (9); sin embargo, una misma enzima es capaz de inactivar a varios aminoglucósidos. Aún cuando se caracterizan por presentar nefro y ototoxicidad, son utilizados en procesos sistémicos severos, ya que se debe considerar que dichos fenómenos tóxicos están directamente relacionados con las dosis y concentración de aminoglucósido que se emplee. Con base en los azúcares que los constituyen, los aminoglucósidos se clasifican de la siguiente manera: (61)

- 1).- Contienen estreptidina: Estreptomina.
- 2).- Contienen desoxiestreptamina.
  - a).- Los sustituyentes están en hidroxilos no terminales
    - Kanamicina, amikacina, dibekacina.
    - Nebramicinas: gentamicina, tobramicina, sisomicina, netilmicina.
  - b).- Los sustituyentes están en hidroxilos adyacentes.
    - Neomicina, Pramomicina.
- 3).- Aminociclitolos: espectinomina.

La estreptomina fue aislada en 1944, a partir de Streptomyces

griseus, de acuerdo a su azúcar constituyente se clasifica dentro del grupo de la estreptidina. Existe asociada con diferentes sales, la que presenta efectos colaterales, es el sulfato. Su espectro antimicrobiano incluye: Mycobacterium tuberculosis, Brucella sp., Streptococcus faecalis, Streptococcus viridians, Franciscella tularensis y Yersinia pestis. (52)

La kanamicina fue aislada en 1957 por Omezawa, a partir de ---- Streptococcus kanamyceticus. Su consumo ha sido muy elevado, fue muy utilizada hasta la aparición de otros aminoglucósidos como la gentamicina, la cual ofrece mayor biodisponibilidad y farmacocinética.

La kanamicina se liga poco a las proteínas del plasma, difunde bien en los líquidos orgánicos y no penetra bien la barrera hematoencefálica. Actúa eficazmente contra E. coli, Klebsiella, Proteus, Enterobacter (16).

El primer aminoglucósido semisintético fue la amikacina, el cual se obtuvo a partir de la kanamicina A con el fin de evitar los problemas ocasionados por la resistencia de las enterobacterias y Pseudomonas aeruginosa a las nebramicinas, originada por la presencia de un gran número de enzimas inactivantes (23). Es utilizada donde las cepas multirresistentes ocasionan problemas terapéuticos. Presentan un mayor espectro antimicrobiano que incluye a Klebsiella, P. aeruginosa y Providencia. (59)

La gentamicina es producida por los hongos Micromonospora purpúrea y Micromonospora echinospora (20,86). Es una mezcla de tres gentamicinas:  $C_1$ ,  $C_{1a}$ , y  $C_2$  (71).

Presenta un amplio espectro antimicrobiano, ya que actúa contra la mayor parte de bacterias gram negativas. Circula ligada a las proteínas plasmáticas y alcanza niveles adecuados en los tejidos. Su utilización ha sido muy amplia desde el momento de su aparición en procesos de patología

grave, a pesar de su elevada nefro y ototoxicidad (2, 42, 86).

La tobramicina es producida por Streptococcus tenebrarius, presenta un espectro antimicrobiano similar al de gentamicina difiriendo únicamente en presentar mayor actividad contra P. aeruginosa. Es ligeramente nefro y ototóxica.

La sisomicina es producida por Micromonospora nyoensis, se considera muy semejante a gentamicina y no ha aportado ninguna novedad, su utilización es escasa (35).

La netilmicina es un derivado de la sisomicina (etil sisomicina). Presenta comportamiento similar al de gentamicina con escasa utilización (35).

La neomicina y la paramomicina son azúcares complejos, generalmente se les administra por vía oral o en forma superficial, dado a que no se absorben. Presentan elevada nefro y ototoxicidad, por lo que no son antibióticos de elección para ninguno de los microorganismos de las enfermedades comunes, pero en algunos casos son usados en las gastrointestinales (12).

La espectinomicina es obtenida a partir de Streptococcus spectabilis y de Streptococcus flavopersicus. No se liga casi nada a las proteínas del plasma. Presenta acción definida contra Neisseria gonorrhoeae y tiene gran éxito terapéutico en el tratamiento de gonococcias uretrales y anales (56).

Dentro de los antibióticos beta lactámicos se incluyen: a las penicilinas y a las cefalosporinas.

La penicilina G es producida por los hongos Penicillium notatum

y Penicillium chrysogenum (29). Este compuesto presenta una estructura química que consta de un anillo heterocíclico de tiazolidina unido a un anillo betalactámico con una cadena lateral, la cual da lugar a la diversidad en la familia. El núcleo básico es el ácido 6 aminopenicilánico (64). Circula combinada no covalentemente con la albúmina plasmática alcanzando niveles adecuados en los fluidos intersticiales y tejidos.

Su acción se lleva a cabo inhibiendo la síntesis de la pared celular (5). Es el antibiótico de primera elección contra S. pyogenes, Treponema pallidum, Corynebacterium diphtheriae, C. tetani, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae (no productoras de beta lactamasas), Streptococcus beta hemolíticos (grupos B, C, F, y G) y microorganismos anaerobios (7).

Se puede presentar en tres formas:

- 1.- Como sal sódica o potásica llamándose penicilinas cristalinas.
- 2.- Penicilina G procaína, a la cual se le adiciona procaína lo que ocasiona una absorción lenta y un retardo en su eliminación.
- 3.- Penicilina G benzatína que es un producto de la modificación de la penicilina G con una base de amonio, presentando mucho menor absorción.

La penicilina V u oral, es producida por los mismos hongos que biosintetizan la variedad G (29). Esta penicilina es la fenoximetil penicilina, se presenta en forma de sal potásica con un espectro antimicrobiano similar a la variedad G. Para su circulación se liga a las proteínas del plasma (5).

Otro de los grupos de la penicilina se halla constituido por las isoxazolilpenicilinas, que son un grupo de antibióticos semisintéticos. Químicamente el grupo se encuentra constituido por el ácido 6 aminopenicilánico y un radical isoxazolil (oxacilina), con un átomo de cloro adicional (cloxacilina) o con dos átomos de cloro (dicloxacilina). Todos estos compuestos presentan características terapéuticas similares (64). Para su circulación se -

ligan a las proteínas del plasma y están indicadas exclusivamente en las infecciones originadas por los estafilococos productores de beta lactamasas (7).

Otro de los grupos de la penicilina son las aminopenicilinas en la cual se incluyen a la ampicilina y a la carbenicilina

La ampicilina se obtiene al incluir un radical amino en el puente metilénico de la cadena lateral de la bencil penicilina (alfa amino bencil, penicilina) (8). Presenta un espectro antimicrobiano más amplio que el de las penicilinas naturales, además de penetrar con menor dificultad por lo que su uso ha sido muy grande. Sin embargo, resulta ineficaz contra Pseudomonas, algunos microorganismos del género Proteus, M. pneumoniae y S. aureus, betalactamasa positivo. Las cepas de Salmonella (especialmente Salmonella typhimurium) y Shigella, presentan recientemente menor sensibilidad a este fármaco (81).

La carbenicilina se obtuvo a partir de la inclusión de un grupo carboxilo en la cadena lateral del ácido 6 aminopenicilánico (71). Presenta un espectro antimicrobiano mayor que el de la ampicilina debido a que además actúa contra P. aeruginosa y Proteus indol positivo.

El último grupo de la penicilina lo constituye las ureido penicilinas, todas ellas derivan de la ampicilina. Dentro de este grupo se incluye la azlocilina, la mezlocilina y la piperacilina (24, 51).

La azlocilina presenta actividad frente a organismos gram positivos excepto Staphylococcus beta lactamasa positiva y actividad bactericida contra gram negativos (24). La mezlocilina presenta actividad semejante a la carbenicilina. La piperacilina presenta su máxima eficacia contra P. aeruginosa y su acción se ve potencializada al actuar conjuntamente con los aminoglucósidos (51).

El otro grupo que integra a los antibióticos beta lactámicos son las cefalosporinas, éstas fueron aisladas en 1952, a partir de un hongo del género Cephalosporium. Actualmente existe una gran variedad de estos compuestos los cuales se caracterizan por la presencia de un núcleo 7 aminocefalosporánico (60). Considerando sus propiedades, se les ha dividido en tres generaciones, las cuales son directamente proporcionales al espectro antimicrobiano (14).

Primera generación: la constituyen todas aquellas cefalosporinas que presentan acción similar a las isoxazolil penicilinas y se tiene a: cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefacetrilo. Todas ellas no son mejores que la penicilina natural, y en cambio, su costo es más elevado.

Segunda generación: la constituyen todas aquellas cefalosporinas que presentan acción semejante a las ampicilinas, en éstas, se incluye: cefoxitina y cefaclor.

Tercera generación: abarca todas aquellas cefalosporinas que presentan acción contra bacterias beta lactamasa positivas y anaerobias. En este grupo se incluye a: moxalactam, cefotaxima, cefoperazona, cefsulodin, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefmenoxima.

Todas ellas, se caracterizan por su gran facilidad para difundir a diversos órganos y por presentar el espectro antimicrobiano más amplio; sin embargo, su utilización no se ha extendido, ya que cada uno de estos compuestos son sumamente costosos.

Las cefalosporinas pueden ser inactivadas por la apertura del anillo beta lactámico, por desaminación, y por desacetilación (60).

En la tabla #2 del anexo, se muestra la proliferación que han tenido los antimicrobianos desde su aparición en 1929, hasta la explosiva pendiente que muestran para los años 80s (70). Se puede observar fácilmente el incremento que han tenido los antimicrobianos en las dos últimas décadas, hecho que si bien ha sido útil para la humanidad, también ha propi-

ciado alteraciones en el equilibrio de las floras, aparición de cepas resistentes, selección de clonas bacterianas que emergen como "nuevos microorganismos" debido al uso muchas veces indiscriminado que se ha hecho de los mismos.

En todo proceso infeccioso es muy importante la selección del antimicrobiano adecuado, lo cual requiere del conocimiento de la susceptibilidad del microorganismo causante, entender la farmacocinética y considerar los fenómenos de absorción, uniones con proteínas, penetración en tejidos, metabolismo, excreción y toxicidad.

La acción de los antimicrobianos se lleva a cabo principalmente sobre: las síntesis de la pared celular y de ácidos nucleicos, en el funcionamiento de la membrana citoplásmica y en la síntesis de proteínas, esto se esquematiza en la figura #1 del anexo.

Las bacterias se caracterizan por ser células procariotas de -- gran sencillez estructural, ya que no presentan membrana celular, sistema retículo endoplásmico, aparato de Golgi, ni mitocondrias. Sus componentes estructurales básicos se pueden dividir de la siguiente forma (74):

- 1).- Material Genético: todas las bacterias tienen el equivalente de una célula eucariótica, aunque la composición de proteínas es diferente, así como el material extracromosómico integrado en los llamados plásmidos. Tanto el material cromosómico como el extracromosómico están constituidos por ADN en cuyo conjunto se encuentra toda la potencialidad genética de una célula, codificando para los componentes estructurales y también para los que intervienen en la fisiología del microorganismo. Esto se logra mediante los procesos de transcripción y traducción.
- 2).- Citoplasma: contiene ribosomas y multitud de sistemas enzimáticos que intervienen en diversas rutas metabólicas.
- 3).- Membrana citoplasmática: en su composición presentan diferencias en el contenido y tipo de lípidos con respecto a las células eucariotas. Funciona como una barrera de permeabilidad selectiva.
- 4).- Envoltura externa: constituida por la pared celular y otras estructuras que la envuelven. Les confiere forma y la reacción característica con la tinción Gram (excepto micoplasma). Su componente primario es el mucopéptido,

polímero ramificado que tiene cadenas lineales que se entrelazan para formar una especie de malla.

Cada antimicrobiano exhibe ventajas y desventajas al momento de ser elegido para emplearse en determinado proceso infeccioso. No es posible contar con el antimicrobiano ideal, el cual se cree que debiera presentar las siguientes características (32, 33):

- Mostrar toxicidad 100% selectiva, inhibiendo o destruyendo microorganismos pero sin dañar al huésped.
- No propiciar la selección de cepas resistentes.
- Ser efectivo contra un número específico de microorganismos.
- Ser hidrosoluble.
- Presentar adecuada capacidad de penetración.
- Carecer de las propiedades alergénicas, y no mostrar efectos adversos a pesar de su administración en dosis elevadas.
- Continuar con su actividad a pesar de ser metabolizado.
- Mantener sus concentraciones por períodos prolongados.
- Permanecer activos en diversos fluidos orgánicos.

Como se puede apreciar, el antimicrobiano ideal es muy difícil que llegue a existir, ya que en algunas infecciones el agente etiológico es inhibido por ciertos antimicrobianos, por ejemplo: la penicilina inhibe a Streptococcus beta hemolítico, C. diphtheriae, mientras que en otros casos hay heterogeneidad en la sensibilidad, este es el caso de las Enterobacterias, Enterococos y Pseudomonas (47, 50); por lo que se considera necesario continuar desarrollando técnicas in vitro que nos permitan correlacionar los resultados, estas técnicas deben ser desarrolladas en el laboratorio clínico (79).

Como se ha visto, los antimicrobianos tienen un papel relevante en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, por lo cual, a través del tiempo han existido diversos métodos cada vez más exactos, a fin de cuantificarlos en los diferentes fluidos biológicos. Entre estos métodos se cuentan (48):

- 1.- Métodos microbiológicos: difusión en agar, turbidimetría, inhibición en el cambio de pH y métodos radiométricos.
- 2.- Métodos químicos clásicos.
- 3.- Métodos inmunológicos: radioinmunoensayo, ensayo inmunoenzimático, ensayo inmunofluorescente, inhibición de aglutinación de partículas.
- 4.- Métodos enzimáticos: ensayos radioenzimáticos, ensayos colorimétricos.
- 5.- Métodos potenciométricos.
- 6.- Métodos cromatográficos: cromatografía líquida de alta presión, y cromatografía gas-líquido.

Entre todos ellos el más usado es el método de difusión en agar, sin embargo, hay que destacar que la cromatografía de alta presión y los ensayos radioenzimáticos están adquiriendo gran popularidad.

#### IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.

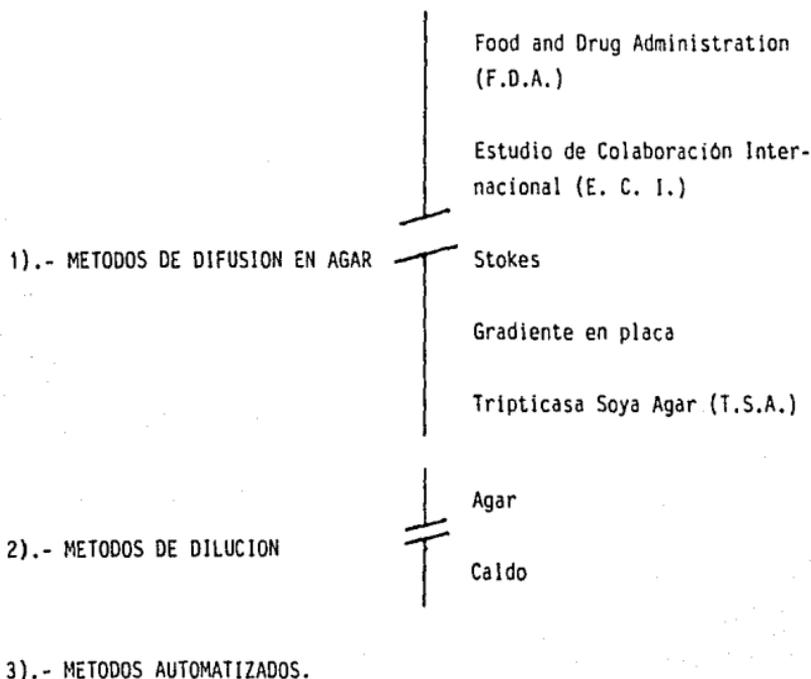
Antes de elegir el método para evaluar la susceptibilidad bacteriana a determinado antimicrobiano, se deben considerar los siguientes factores:

- Número de pruebas a efectuar.
- Tipo de microorganismo y lugar de aislamiento.
- Características del agente antimicrobiano que se va a emplear.
- Características generales del huésped.

Una vez que se ha tomado en cuenta lo anterior se tienen a disposición varios métodos para evaluar dicha susceptibilidad bacteriana, hecho del que se tiene conocimiento desde 1952, año en el cual Humphrey y -- Leighdown (37) dieron una descripción detallada para la difusión de antibióticos en un medio a base de agar. Cooper y Gilesple (19) ampliaron poco después esta información con la presentación del concepto " tiempo crítico" el cual es la condición para que después de un cierto intervalo un microorganismo pueda ser capaz de crecer a diferentes etapas de la concentración mínima que se utilice de un determinado antimicrobiano. Cooper (19), mostró claramente que las pruebas de susceptibilidad bacteriana en disco no dependen solamente del microorganismo y su susceptibilidad, sino también de su difusión.

Fass et. al. (27, 67) describieron pruebas de dilución en caldo simplificadas, Hauser (36) desarrolló una modificación a este método, en 1966 este método vuelve a ser descrito por Wayne y Krasnow (80) para pruebas de susceptibilidad de antimicrobianos para las cepas de Mycobacterium y usaban discos de papel como acarreador del agente antimicrobiano. Más recientemente se ha descrito un procedimiento similar para bacterias facultativas. Wilkins y Thiel (83) usaban también discos de papel filtro como a acarreadores del antimicrobiano en un procedimiento llamado "disco en caldo", el cual es un procedimiento similar al realizado por Wayne y Krasnow (80).

Ahora bien, los métodos microbiológicos más usuales para evaluar la susceptibilidad bacteriana, así como las técnicas empleadas en cada uno se muestran enseguida ( 48 ) :



## MÉTODOS PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE DISCOS.

Para el método de difusión en agar, se utilizan discos de papel absorbente, el cual no debe interferir ni con la cepa ni con el antimicrobiano en estudio. Cada disco se impregna con la concentración del antimicrobiano que se requiera para luego colocarse sobre una capa de agar, a fin de permitir su difusión; esta capa se encuentra sembrada o inocuada previamente con el microorganismo en estudio.

Una vez que ha difundido el antimicrobiano, aparecen zonas claras alrededor de cada disco a las cuales se les llama "zona de inhibición", el diámetro de esta zona está generalmente determinado por los siguientes factores: composición del medio, pH del medio, grosor del medio en cada una de las placas, enzimas bacterianas, concentración bacteriana, cantidad de antimicrobiano que presenta cada disco, tamaño del disco y difusibilidad (6, 22).

La susceptibilidad se mide en función de la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo visible, parámetro conocido como "concentración inhibitoria mínima" (CIM) la cual puede variar en función del método que se emplea. La correlación entre esta concentración inhibitoria mínima y el diámetro de la zona de inhibición determinan lo que se conoce como "línea de regresión", la cual no es más que la expresión gráfica de la susceptibilidad (6B, 7B).

Este método normalmente es el más usado por ser sumamente sencillo y rápido(4).

Existen diferentes técnicas dentro del método de difusión del disco en agar:

- Food and Drug Administration (F.D.A.); se apoya en la técnica de Bauer y colaboradores (6) y se aplica a microorganismos de crecimiento rápido, no debe aplicarse a microorganismos de crecimiento lento, anaerobios obligados, o capnofílicos y se debe realizar en cultivos puros. Clasifica a los microorganismos, en base al diámetro de la zona de inhibición que presenten, en:

- a).- Resistente  
b).- Susceptible


 Intermedio  
Susceptible

La técnica de la F.D.A. se acepta toda vez que al aplicarse se observa susceptibilidad in vitro y además por su simplicidad, es necesario mantener fijos diversos parámetros para obtener resultados reproducibles (31).

- Estudio de Colaboración Internacional (E.C.I.): en esta técnica también se describen procedimientos de referencia, medios de cultivo y cepas patrón. Es muy similar a la F.D.A., la única diferencia es triba en la magnitud de la siembra y la técnica empleada. Clasifica a los microorganismos en base a la zona de inhibición que presenten, en (65):

- Grupo 1: Susceptibilidad elevada
- Grupo 2: Susceptibilidad moderada.
- Grupo 3: Susceptibilidad leve.
- Grupo 4: Resistente.

- Stokes: Esta técnica se realiza para el control interno de cada disco y/o examen directo de las muestras, en ella sus resultados se expresan en tres categorías (81):

- a).- Sensibles.
- b).- Moderadamente resistentes.
- c).- Resistentes.

- Gradiente en placa: esta técnica se fundamenta en obtener el gradiente del antimicrobiano en la placa; aquí la susceptibilidad de las cepas es inversamente proporcional a la distancia a lo largo de la cual aparece el desarrollo en la placa (77).

- Trypticase Soya Agar (T.S.A.): Esta técnica es muy utilizada a pesar de no ser buena como método estándar debido a que se utiliza un cultivo sin diluir de bacterias en caldo, el inóculo generalmente suele resultar excesivo (39).

Para el método de dilución se realiza una siembra con un número específico de bacterias, cada tubo se inocula con  $10^4$  -  $10^5$  bacterias/ml. Se aplica la dilución en caldo o en agar según sea la inestabilidad del antimicrobiano. (73).

Los métodos automatizados están presentando gran auge en otros países debido a su rapidez y al elevado número de determinaciones que con ellos se pueden realizar. Las cepas se clasifican como resistente o susceptible. Su costo es elevado.

Con estos equipos se requieren períodos de incubación de 4 a 24 horas; sin embargo, se estudian sistemas para acortar este tiempo a 2 horas, todos estos métodos tienen su base en el Autobac (30), equipo que usa la luz para detectar el crecimiento de las bacterias y cómo éste es afectado por el antimicrobiano.

Para darnos idea de lo avanzado de estos sistemas, mencionaremos uno de los estudios realizados con este método, el cual consistió en verificar cómo y en qué proporción microorganismos contaminantes alteraban la interpretación de la susceptibilidad original observándose que niveles de contaminación de más del 5%, son los que se requieren para que aparezcan estos cambios. (76).

#### TECNICA DE BAUER - KIRBY.

De todos los métodos mencionados anteriormente para evaluar la susceptibilidad bacteriana a determinado antimicrobiano, como ya se dijo, el más usado es el de difusión de disco en agar y dentro de éste, la técnica de Bauer - Kirby (6,55) cuyo objetivo es determinar la susceptibilidad o resistencia de un microorganismo a un determinado antimicrobiano. El medio empleado para la prueba es Muller - Hinton cuyo pH final deberá ser 7.2 a 7.4, realizándose la prueba de la siguiente manera (6,11): con una asa se toman 4 ó 5 colonias aisladas del mismo tipo morfológico y se inoculan en 4 ó 5 ml de medio de cultivo, pudiendo ser caldo Muller - Hinton o Caldo soya triptica-----

sa . Se incuba a 35°C hasta que aparece una leve turbiedad, usualmente de 2 a 5 horas o bien 18 horas a 37°C. La turbidez se ajusta con caldo estéril, tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Se ajusta por comparación visual, agitando los tubos antes y durante el proceso. En el momento del ajuste, se recomienda utilizar un fondo blanco con una línea negra de contraste. Una vez preparado el estándar de turbidez, se puede almacenar por 6 meses pero si se sellan los tubos al calor, la vida media es mayor.

Cuando el tiempo no permita el desarrollo completo de la técnica ésta podrá abreviarse suspendiendo las colonias aisladas en solución salina estéril para ajustar la turbiedad. La suspensión ajustada del inóculo NO debe permanecer más de 15 a 20 minutos antes de proceder a sembrarla en la caja de Petri.

Para inocular el agar, se utiliza un hisopo de madera y algodón, el cual se humedece con la suspensión, se quita el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, para arriba del nivel del caldo. Se estría el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo uniforme. Se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar.

Se deja reposar 3 a 5 minutos, para que se seque el inóculo, pero no más de 15 minutos. Los discos se colocan presionando ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie. Se deberá prevenir una sobreposición de las zonas de inhibición con una distribución adecuada de los discos y con un límite de 15 mm de separación de la pared de la caja de Petri ( en una de 150 mm podrán colocarse 12 o 15 discos y sólo 4 o 5 en una de 100 mm ).

Después de 15 minutos de haber sido colocados los discos, se invierte la caja de Petri y se incuba a 37°C. Cualquier retardo de la incubación dará una excesiva predifusión de los antimicrobianos. La incubación en atmósfera con alto contenido de CO<sub>2</sub> afecta el pH de la superficie del medio alterando la actividad de algunos antimicrobianos, por lo que NO deberá em-

plearse. El tiempo de incubación es de 16 a 18 horas, al cabo de los cuales se realiza la medición de los halos de inhibición con compases de calibración Vernier, regla o plantilla diseñada para este propósito, por el fondo de la caja, la cual se ilumina con luz reflejada.

El punto final de todos los sistemas de lectura será una completa inhibición del crecimiento determinada visualmente, ignorando colonias tenues o muy pequeñas que pueden observarse con minuciosidad. Las colonias grandes que aparecen entre la zona clara de inhibición pueden ser variantes resistentes o bien un inóculo mezclado por lo que se recomienda verificar la pureza de éste con un frote o tinción, o aún una reidentificación completa.

Cada fabricante de discos impregnados con antimicrobiano, al efectuar la técnica de Bauer - Kirby, deberá contemplar como requisito que cada una de las líneas de regresión, obtenidas como consecuencia de la evaluación de un gran número de cepas a diferentes concentraciones, presenten un coeficiente de correlación lo más cercano a uno.

#### TECNICA DESCRITA EN LA FARMACOPEA

Asimismo, es necesario realizar pruebas de control para comprobar que efectivamente el contenido por disco de antimicrobiano es el correcto, para esto se requiere desarrollar una técnica descrita en la Farmacopea, en la que se utiliza una capa base y una capa sembrada con las cepas y medios específicos para cada antimicrobiano ( ver tabla #6 del anexo ).

Para la realización de esta técnica se requiere, además, de una suspensión de bacterias ajustadas a una determinada concentración; se inocular uno de los medios con esta suspensión y luego se vierte sobre la capa base, se deja solidificar. Se colocan los discos problema y los de diferentes concentraciones de antimicrobiano.

Después de incubar, se determinan los halos de inhibición con la ayuda de un Vernier. Se realiza la línea de regresión correspondiente, interpolando el valor del disco problema, a fin de obtener el contenido por disco.

Por todo lo anterior, se puede deducir que la técnica descrita en la Farmacopea requiere de un gran número de requisitos :

- Preparar medios diferentes, de acuerdo al antimicrobiano que se trata ( ver tabla # 6 del anexo ).
- Emplear una cepa específica para cada antimicrobiano ( ver tabla # 6 del anexo ).
- Colocar un volumen específico de medio en la capa base y en la capa sembrada.
- Ajustar el pH, de acuerdo al medio que se trate.

CAPITULO II  
PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL

Antimicrobianos: elegidos de acuerdo al uso y disponibilidad de las cepas y medios necesarios:

Amikacina  
Ampicilina  
Cloramfenicol  
Cloxacilina  
Eritromicina  
Gentamicina  
Lincomicina  
Penicilina G  
Tetraciclina

Medios de Cultivo recomendados por la F.D.A. para la realización de la técnica de referencia (ver formulaciones en la tabla # 7 del anexo):

Medio A  
Medio C  
Medio E  
Medio I  
Medio Muller - Hinton  
Medio Agar de Soya Trypticaseína  
Caldo de Soya Trypticaseína

Estandar de Mc Farland 0.5 M

0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Cepas:

Sarcina lutea ATCC 9341  
E. coli ATCC 25923  
S. aureus ATCC 25922  
S. aureus ATCC 13150  
Streptococcus faecalis ATCC 14506

**Soluciones:**

Metanol Q.P.

Solución salina 0.85 %

Agua Destilada

Amortiguador de fosfatos pH = 8

Amortiguador de fosfatos pH = 6

Hidróxido de Sodio 1 N

Discos vírgenes de papel filtro

Tubos de ensaye

Placas de Petri de 100 mm

Embudo

Goterros

Frascos de vidrio

Pipetas 10 ml, 5 ml, 0.1 ml

Pipeta Pasteur

Asa de platino

Mechero

Hisopos de algodón

Pinzas

Vernier

**METODOLOGIA**

1) Técnica de Referencia (48,78).

1) Preparar los medios indicados para cada antimicrobiano (ver tabla # 6 del anexo).

2) Sembrar masivamente cada una de las cepas recomendadas (ver tabla # 6 del anexo) en medio Muller - Hinton. Cosechar y ajustar visualmente la turbiedad con el estándar de Mc Farland 0.5 M.

3) Ajustar la concentración bacteriana como sigue:

Amikacina

$8.82 \times 10^6$  ufc/ml

Ampicilina	$28.3 \times 10^6$ ufc / ml
Cloramfenicol	$10.8 \times 10^6$ ufc / ml
Cloxacilina	$32.6 \times 10^6$ ufc / ml
Eritromicina	$18.42 \times 10^6$ ufc / ml
Gentamicina	$8.82 \times 10^6$ ufc / ml
Lincomicina	$12.9 \times 10^6$ ufc / ml
Penicilina G	$18.42 \times 10^6$ ufc / ml
Tetraciclina	$12.39 \times 10^6$ ufc / ml

4) Colocar en una placa de Petri 42 ml del medio recomendado de acuerdo al antimicrobiano que se va a trabajar. Dejar solidificar ( ver tabla #6 del anexo ).

5) Colocar 8 ml del medio recomendado ( según el antimicrobiano que se va a trabajar ) con la concentración bacteriana previamente recomendada ( ver tabla # 6 del anexo ).

6) Colocar en una placa de Petri 3 discos de papel filtro con una misma concentración y 2 discos de papel filtro con la concentración de referencia.

Trabajar por duplicado ( los discos ya impregnados se encuentran a temperatura ambiente ).

7) Incubar las placas de Petri 24 horas 37°C.

8) Anotar los diámetros de los halos de inhibición que aparecen alrededor de cada disco de papel filtro. La lectura debe realizarse con un Vernier.

9) Realizar las gráficas de las líneas de regresión para cada uno de los antimicrobianos.

10) Calcular el punto de máxima concentración ( H ) y el punto de mínima concentración ( L ) para cada antimicrobiano por medio de las siguientes fórmulas ( 4B ).

$$H = ( 3e + 2d + c - a ) / 5$$

$$L = ( 3a + 2b + c - a ) / 5$$

Donde

a,b,c,d,e = Promedio del diámetro de las zonas observadas para cada concen-

tración ;a. corresponde al valor de la mínima concentración.

11) Graficar los puntos anteriores.

12) Interpolarse el valor del diámetro del disco problema a fin de conocer el contenido de antimicrobiano en cada uno de ellos.

Enseguida, a través de la ecuación de la recta se debe de determinar matemáticamente el contenido de antimicrobiano en cada disco, obtener matemáticamente el grado de correlación de cada una de las líneas de regresión obtenidas y determinar la proporcionalidad existente entre este método y el método de siembra en superficie.

#### II Técnica de Siembra en Superficie

1) Sembrar cada una de las cepas E. coli ATCC 25922 y S. aureus ATCC 25923 en Medio Agar de Soya Trypticasa.

2) Aislar colonias de cada una de las cepas.

3) Tomar 5 colonias aisladas de cada cepa y colocarlas con un asa de platino en tubos de ensaye. Incubar 4 - 5 horas a 37° C.

4) Ajustar visualmente la turbiedad de cada uno de los tubos incubados con el estándar de Mc Farland 0.5 M. Este ajuste se hace con caldo de soya triptica-sa estéril.

5) Colocar 50 ml de medio Muller - Hinton esterilizado, pH 7.2 - 7.4 en placas de Petri. Dejar solidificar.

6) Tomar un hisopo estéril y sumergirlo en el tubo de la cepa ya ajustado, - escurrirlo y sembrar cada una de las placas de Petri. Se debe usar un hisopo por cada placa.

7) Colocar en cada placa de Petri 3 discos de papel filtro con una misma - concentración y 2 discos de papel filtro con la concentración de referencia. Trabajar por duplicado. (Los discos ya impregnados se encuentran a temperatura ambiente).

8) Incubar las placas de Petri 24 horas a 37° C.

9) Anotar los diámetros de los halos de inhibición que aparecen alrededor de cada disco de papel filtro. La lectura se realiza con un Vernier.

10) Calcular el punto de máxima concentración (H) y el punto de mínima concentración (L) para cada antimicrobiano, por medio de las siguientes fórmulas (63):

$$H = (3e + 2d + c - a) / 5$$

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5$$

donde a,b,c,d,e, = promedio del diámetro de las zonas observadas para cada concentración; a, corresponde al valor de la mínima concentración.

11) Graficar los puntos anteriores.

12) Interpolar el valor del diámetro del disco problema a fin de conocer el contenido de antimicrobiano en cada uno de ellos.

Ahora, a través de la ecuación de la recta se debe determinar matemáticamente el contenido de antimicrobiano en cada disco, obtener matemáticamente el grado de correlación de cada una de las líneas de regresión obtenidas y determinar la proporcionalidad existente entre este método y el método de referencia.

III) Establecimiento de un Factor.

Establecer un factor para que a partir de un valor de referencia (c) se establezcan puntos por arriba (e,d) y por debajo (b,a) del mismo. El factor adecuado es 1.5; debido a que con él se obtiene una línea de regresión lineal a partir de un valor máximo y de uno mínimo, además de que nos permite cumplir con el rango de aceptación indicado en la Farmacopea (78).

IV) Preparación de las Diluciones e Impregnación de los Discos.

Preparar las diluciones apropiadas para cada antimicrobiano tomando en cuenta la potencia del antimicrobiano, el volumen que se desea preparar, así como el disolvente y el diluyente adecuado a cada antimicrobiano (ver Tablas # 3 y 4 del anexo). Se trabajará con 2 valores por arriba y por debajo del valor de referencia, de este modo se tendrán 5 valores de contenido por disco y 5 valores de concentración para cada antimicrobiano, es decir:

## Amikacina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	13.3	20	30	45	67.5
Concentración (mg/ml)	1.33	2	3	4.5	6.75

## Ampicilina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	4.4	6.6	10	15	22.5
Concentración (mg/ml)	0.44	0.66	1	1.5	2.25

## Cloramfenicol

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	13.3	20	30	45	67.5
Concentración (mg/ml)	1.33	2	3	4.5	6.75

## Cloxacilina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	.44	.66	1	1.5	2.25
Concentración (mg/ml)	.044	.066	.1	.15	.225

## Eritromicina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	6.6	10	15	22.5	33.75
Concentración (mg/ml)	.66	1	1.5	2.25	3.375

## Gentamicina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	4.4	6.6	10	15	22.5
Concentración (mg/ml)	.44	.66	1	1.5	2.25

## Lincomicina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	.88	1.33	2	3	4.5
Concentración (mg/ml)	.088	.13	.2	.3	.45

## Penicilina G

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	3.3	6.6	10	15	22.5
Concentración (mg/ml)	.33	.66	1	1.5	2.25

## Tetraciclina

Puntos	a	b	c	d	e
Contenido/disco (mcg)	13.3	20	30	45	67.5
Concentración (mg/ml)	1.33	2	3	4.5	6.75

Cada disco se debe impregnar con 10 lambdas.

$$\frac{\text{Contenido/disco}}{\text{mcg}} / 0.01 \text{ ml} = \frac{\text{Concentración}}{\text{mcg/ml}}$$

$$\frac{\text{Concentración}}{\text{mcg/ml}} / 1000 = \frac{\text{Concentración}}{\text{mg/ml}}$$

## V) Selección de cepas y medios.

Seleccionar las cepas y medios de cultivo de acuerdo a la Tabla # 5 del anexo.

## METODO ALTERNATIVO

Por lo anteriormente expuesto, propongo una técnica alternativa que se caracterice por la exactitud y sencillez, así se tiene esta técnica alternativa que utiliza únicamente dos cepas: E. coli ATCC 25922 y S.aureus ATCC 25923, un solo medio de cultivo (Muller - Hinton), realiza la siembra en superficie y establece líneas de regresión para cada antimicrobiano.

## CAPITULO III

## RESULTADOS Y ANALISIS

Se efectuaron tres pruebas por duplicado con cada una de las concentraciones establecidas, obteniéndose seis valores para cada concentración, con estos valores se obtuvo un promedio para cada concentración, lo cual se reportó como Grupo Uno ( $G_1$ ), siguiéndose el mismo procedimiento para el Grupo Dos ( $G_2$ ) y el Grupo Tres ( $G_3$ ), así como para el resto de los antimicrobianos.

Se calculó el punto de máxima concentración (H), el punto de mínima concentración (L), y el coeficiente de correlación lineal (r) para cada uno de los grupos, a fin de conocer la proporcionalidad existente. Ver Tablas # 8 - 16.

Con una Calculadora Texas Instruments T I Programable 59 adicional de un módulo de estadística, se llevó a cabo un análisis de variancia de bloques con un nivel de significancia (Q F) del 1% con el fin de conocer la variación entre los Grupos ( $Q F_c$ ) de una misma técnica. Esto se realizó para ambas técnicas. Ver Tabla # 17.

Expresando lo anterior en forma matemática se tiene

$$Q(F) = \int_a^b f(u) du$$

Lo cual se interpreta gráficamente de la siguiente manera:



sis:

- Para efectuar dicho análisis se plantearon las siguientes hipótesis:
- $H_0$  : No hay diferencia entre los grupos
  - $H_1$  : Hay diferencia entre los grupos
  - $H_0$  : No hay diferencia en el contenido por disco
  - $H_1$  : Hay diferencia en el contenido por disco.

Hay que recordar que para poder aceptar la Hipótesis Nula ( $H_0$ ), es necesario que los valores encontrados se localicen dentro del área de aceptación (tener presente que se está trabajando con un nivel de significancia (Q F del 1%) , por lo que el área de aceptación es de 99%, ya que de no ser así, se aceptará la Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ).

Al analizar la variación del contenido por disco (Q F) en cada uno de los antimicrobianos por ambas técnicas, se encontró que en ambas los valores son inferiores al 1% con lo cual se cae en la zona de rechazo de la Hipótesis Nula, y por lo tanto, se acepta que existen diferencias en el contenido por disco de ambas técnicas.

Por otro lado, al comparar el valor F de la Tabla ANOVA para un intervalo de confianza de 99%, 4 grados de libertad en el numerador y 8 grados de libertad en el denominador, con los valores obtenidos (ver Tabla # 17), se ratifica que existe diferencia en el contenido por disco en cada uno de los antimicrobianos en ambas técnicas, dado que el valor F de la Tabla ANOVA es de 7.01.

Posteriormente, se realizó la variación entre los grupos ( $Q F_c$ ) para cada uno de los antimicrobianos por una y otra técnica. En la técnica de referencia, se encontró que en Ampicilina, Eritromicina, Gentamicina, Lincomicina, Penicilina G y Tetraciclina, los valores son inferiores de 1%, por lo que se rechaza la hipótesis de que no hay diferencia entre los grupos de estos seis antimicrobianos. Mientras que en la técnica de Siembra en Superficie, únicamente Eritromicina presenta un valor inferior al 1%. Ahora bien, al comparar el valor F de la Tabla ANOVA para un intervalo de confianza del 99%, 2 grados de libertad en el numerador y 8 grados de libertad en el denominador con los valores obtenidos (ver Tabla # 17), se tiene que las diferencias encontradas entre los grupos de algunos antimicrobianos carecen de importancia, ya que, el valor F de la Tabla ANOVA es de 8.65 y que por lo tanto, no hay diferencias entre los grupos de cada uno de los antimicrobianos en ambas técnicas.

Realizaremos una Prueba t para comparación de medias en muestras independientes entre la técnica de Referencia y la Técnica de Siembra en Super-

ficie tanto para el método gráfico, como para el método matemático.

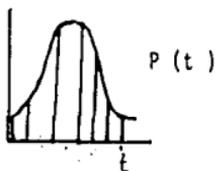
Ho: La Técnica de Siembra en Superficie no se distingue de la Técnica de Referencia.

Hi: La Técnica de Siembra en Superficie se distingue de la Técnica de Referencia.

Expresando lo anterior en forma matemática, se tiene;

$$P(t) = \int_{-\infty}^t f(u) du$$

Lo cual se interpreta gráficamente de la siguiente manera:



Al analizar la diferencia entre estas dos medias de poblaciones, obtenemos valores que caen en la región de rechazo de la Hipótesis Nula (ver Tabla # 18), lo cual nos conduce a aceptar la Hipótesis Alternativa: La Técnica de Siembra en Superficie se distingue de la Técnica de Referencia. Ahora bien, para un intervalo de confianza de 99% y 14 grados de libertad, se tiene un valor  $t$  en tablas de 2.62 y al comparar los valores de  $t$  obtenidos, (ver Tabla # 18), con este valor se ratifica que la Técnica de Siembra en Superficie se distingue de la Técnica de Referencia, y por consiguiente, se trata de técnicas estadísticamente diferentes.

Finalmente, se realizará otra prueba para verificar si a partir de estas dos técnicas con valores de contenido por disco diferentes, gráfico y matemático, se pueden llegar a establecer resultados similares.

Para efectuar esta prueba, se trabajará con un intervalo de confianza  $P(t)$  del 99% con las siguientes hipótesis:

Ho: El valor de contenido por disco de la Técnica de Referencia no presenta variación con respecto al valor de contenido por disco de la Técnica de Siembra en Superficie.

Hi: El valor de contenido por disco de la Técnica de Referencia presenta variación con respecto al valor de contenido por disco de la Técnica de Siembra en Superficie.

Después de analizar los valores obtenidos (ver Tabla # 19), podemos aceptar la Hipótesis Nula y ratificar este hecho al comparar estos valores con el valor  $t$  de las Tablas # 6 y 9, con excepción de Lincomicina, ya que este antimicrobiano es gráfica y matemáticamente significativo.

TABLA N° 8

AMIKACINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)	diámetro (mm)			Cont/Disco (mcg)	diámetro (mm)		
67.5	GRUPO 1 27.6	GRUPO 2 28	GRUPO 3 27.9	67.5	GRUPO 1 22.6	GRUPO 2 22.4	GRUPO 3 22.7
45	26.3	26.6	26.3	45	21.3	21.3	21.4
30	24.4	24.8	24.4	30	19.7	19.9	20
20	23.1	23.2	23	20	18.6	18.7	18.7
13.3	21.6	21.4	21.5	13.3	19.5	17.5	17.4
r	.97	.96	.98	r	.94	.97	.97
L	21.5	21.4	21.5	L	17.2	17.4	17.3
H	27.6	28.1	27.9	H	22.5	22.4	22.7
Ø	24.6	24.5	24.5	Ø	20	20.5	20
<u>CONT</u> DISCO				<u>CONT</u> DISCO			
Gráfico	29.6	29.5	32	Gráfico	30.2	33	29.5
Mat.	35.1	32.7	34.1	Mat.	30.6	40.7	34.7

**DONDE:**

**$r$  = coeficiente de correlación lineal.**

**$L$  = Punto de mínima concentración**

**$H$  = Punto de máxima concentración**

**$\emptyset$  = Diámetro del disco problema**

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = 8.76 (24.6) + (-180.38)$$

$$Y = 7.96 (24.5) + (-162.32)$$

$$Y = 8.33 (24.5) + (-169.94)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = 12.83 (20) = (-225.94)$$

$$Y = 10.73 (20.5) + (-179.17)$$

$$Y = 10.04 (20) + (-166.05)$$

TABLA N° 9

AMPICILINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)		diámetro (mm)		Cont/Disco (mcg)		Diámetro (mm)	
	GRUPO 1	Grupo 2	Grupo 3		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
22.5	43.5	43	43	22.5	29.8	28.9	28.4
15	42	41.8	41	15	29.7	27.8	27.4
10	40.5	38.1	38.6	10	28.3	26.8	26.7
6.6	38.5	36.1	36.3	6.6	24.2	25.3	25.9
4.4	37.5	33.8	34	4.4	22.7	24.3	24.1
r	.97	.95	.96	r	.86	.96	.92
L	37.3	33.7	34.04	L	23	24.2	24.4
H	43.5	43.3	43.1	H	30.8	28.9	28.6
Ø	40.2	39.5	39.4	Ø	27	26.7	26.5
<u>Cont</u> Disco				<u>Cont</u> Disco			
Gráfico	10.6	11	11	Gráfico	11	10.6	10.8
Mat.	10.7	13.2	13.3	Mat.	11.6	11.9	11.6

**TECNICA DE REFERENCIA**

$$Y = mx + b$$

$$Y = 2.86 (40.2) + (-104.24)$$

$$Y = 1.80 (39.5) + (-57.89)$$

$$Y = 1.95 (39.4) + (-63.67)$$

**TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE**

$$Y = mx + b$$

$$Y = 1.91 (27) + (-39.89)$$

$$Y = 3.77 (26.7) + (-88.76)$$

$$Y = 4.13 (26.5) + (-97.83)$$

TABLA N° 10

## CLORAMFENICOL

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)		diámetro (mm)		Cont/Disco (mcg)		diámetro (mm)	
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
67.5	37.3	37	37.5	67.5	27.7	29.1	28.8
45	34.8	34.3	34.5	45	25.9	26.3	26.6
30	31.6	31.8	31.5	30	24.9	25	24.8
20	29.1	28.9	29	20	22.9	24	22.9
13.3	25.4	25.5	25.3	13.3	21.5	22.1	18.8
	r .96	.96	.96		r .96	.98	.93
	L 25.7	25.8	25.5		L 21.5	22.04	19.6
	H 37.5	37.1	37.5		H 27.6	28.5	29.1
	∅ 31.9	31.6	32		∅ 24.5	24.6	24.1
<u>Cont</u> Disco				<u>Cont</u> Disco			
Gráfico	29	29	30	Gráfico	28.3	24	27
Mat.	30.2	35.4	36.8	Mat.	34.4	29.3	33.5

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = 4.45 (31.9) + (-105.73)$$

$$Y = 4.62 (31.6) + (-110.56)$$

$$Y = 4.42 (32) + (-104.56)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = 8.58 (24.5) + (-175.81)$$

$$Y = 8.15 (24) + (-171.16)$$

$$Y = 5.29 (27) + (-93.97)$$

TABLA N° 11

CLOXACILINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)		Diámetro (mm)		Cont/Disco (mcg)		Diámetro (mm)	
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
2.25	30.5	32.6	31.3	2.25	22	22.9	23
1.5	29	30.2	29.3	1.5	21.2	20.7	21.9
1	26.1	28.1	27.3	1	19.6	18.6	19.4
0.66	25.2	25.4	25.3	0.66	17.1	16.2	16.7
0.44	23.6	23.2	23.3	0.44	13.2	13.9	14.2
r	.97	.97	.97	r	.87	.96	.93
L	23.3	23.1	23.3	L	14.2	13.9	14.4
H	30.4	32.6	31.3	H	22.9	22.9	23.6
Ø	27	27.3	27.3	Ø	19	19.3	19.3
<u>Cont</u> <u>Disco</u>				<u>Cont</u> <u>Disco</u>			
Gráfico	1.05	.9	1	Gráfico	1.1	1.1	1.05
Mat.	1.1	1.06	1.1	Mat.	1.2	1.3	1.2

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = .2541 (27) + (-5.67)$$

$$Y = .1884 (27.3) + (-4.08)$$

$$Y = .223 (27.3) + (-4.91)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = .17.87 (19) + (-2.15)$$

$$Y = .1972 (19.3) + (-2.47)$$

$$Y = .869 (19.3) + (-2.38)$$

TABLA N° 12

ERITROMICINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)	Diámetro (mm)			Cont/Disco (mcg)	Diámetro (mm)		
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
33.7	32.5	30	32	33.7	25.3	25.4	23.9
22.5	30.5	27.5	30.7	22.5	23.5	24.8	22.1
15	28.2	26.2	29.5	15	23	21.8	21.4
10	26.5	24	28.1	10	21.3	20.8	19.7
6.6	24.4	23	26.6	6.6	20.5	19.8	18.9
r	.97	.98	.96	r	.97	.95	.98
L	24,3	22.6	26.6	L	20.3	19.4	18.7
H	32.4	29.6	32	H	25.08	25.5	23.6
∅	27.8	26.8	28	∅	22.3	22.1	21.5
<u>Cont</u> Disco				<u>Cont.</u> Disco			
Gráfico	13.2	18.5	10	Gráfico	13	13.5	16.2
Mat.	15.2	19.8	10.5	Mat.	15.03	15.7	19.1

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = 3.30 (27.8) + (-76.50)$$

$$Y = 3.82 (26.8) + (-82.55)$$

$$Y = 4.92 (28) + (-127.22)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = 5.58 (22.3) + (-109.40)$$

$$Y = 4.20 (22.1) + (-77.07)$$

$$Y = 5.36 (21.5) + (-96.09)$$

TABLA N° 13  
GENTAMICINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont Disco (mg)	diámetro (mm)			Cont Disco (mg)	diámetro (mm)		
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
22.5	28.4	29.1	28.7	22.5	23.2	22.7	21
15	26.1	27.4	26.6	15	21.8	21.1	19.7
10	24.3	26.3	24.5	10	20	19.6	18.3
6.6	22.7	25.1	22	6.6	17.3	17.3	16.9
4.4	20.1	23.8	20.2	4.4	15.3	15.7	15.8
r	.96	.98	.97	r	.95	.96	.97
L	20.3	23.7	20.08	L	15.4	15.7	15.7
H	28.3	28.9	28.7	H	23.7	22.8	20.9
Ø	24.3	24.8	24.8	Ø	19.4	19	19
<u>Cont</u> <u>Disco</u>				<u>Cont</u> <u>Disco</u>			
Gráfico	10	6.3	11	Gráfico	9.8	9.5	12.2
Mat.	11.6	6.3	12.4	Mat.	11.1	10.8	13.9

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = 2.21 (24.3) + (-42.10)$$

$$Y = 3.48 (24.8) + (-79.98)$$

$$Y = 2.06 (24.8) + (-38.64)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = 2.08 (19.4) + (-29.17)$$

$$Y = 2.46 (19) + (-35.90)$$

$$Y = 3.39 (19) + (-50.48)$$

TABLA N° 14

LINCOMICINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)	Diámetro (mm)			Cont/Disco (mcg)	Diámetro (mm)		
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
4.5	23	22.9	23.6	4.5	23.5	22.8	22.1
3	21	20.4	22.5	3	20.4	21.7	21.3
2	19.6	19.7	21	2	17.6	17.3	19.2
1.33	17.8	18	19.5	1.33	15.1	16.2	17.2
0.88	16.3	16.5	18.2	0.88	12.9	15.3	15.3
r	.98	.97	.96	r	.98	.96	.94
L	16.2	16.4	18.2	L	12.6	14.5	15.4
H	22.8	22.5	23.7	H	23.2	22.7	22.5
Ø	20	19.3	20.5	Ø	17	17.5	17.4
<u>Cont</u> Disco				<u>Cont</u> Disco			
Gráfico	2.2	1.9	1.7	Gráfico	1.7	1.6	1.3
Mat.	2.5	2.2	2.04	Mat.	2.03	1.86	1.56

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = .5615 (20) + (-8.66)$$

$$Y = .5817 (19.3) + (-9)$$

$$Y = .6395 (20.5) + (-11.06)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = .3398 (17) + (-3.74)$$

$$Y = .4125 (17.5) + (-5.35)$$

$$Y = .4821 (17.4) + (-6.82)$$

TABLA N° 15

PENICILINA G

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco (mcg)	Diámetro (mm)			Cont/Disco (mcg)	Diámetro (mm)		
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
22.5	44	43.2	43	22.5	33.2	34.4	33.4
15	42.2	41	41.5	15	32.4	32	32.2
10	40.5	39	40	10	31.4	31.2	30.6
6.6	38.5	37	38	6.6	30.3	30	29.2
3.3	36	34	35	3.3	28.9	28.4	27
r	.96	.97	.94	r	.95	.98	.96
L	36.3	34.3	35.6	L	29.1	28.4	27.3
H	44.1	42.3	43.4	H	33.3	34	33.6
Ø	30.4	30.5	30.4	Ø	31.4	31.4	30.4
<u>CONT</u> DISCO				<u>CONT</u> DISCO			
Gráfico	9.3	9	9.2	Gráfico	9	9.3	9
Mat.	11.6	11.4	11.1	Mat.	11.8	11.9	11.2

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = 2.18 (30.7) + (-55.28)$$

$$Y = 2.21 (30.5) + (-55.95)$$

$$Y = 2.38 (30.4) + (-61.29)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = 4.24 (31.4) + (-121.27)$$

$$Y = 3.31 (31.4) + (-91.96)$$

$$Y = 2.88 (30.4) + (-76.36)$$

TABLA No. 16  
TETRACICLINA

TECNICA DE REFERENCIA				TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE			
Cont/Disco		Diámetro		Cont/Disco		Diámetro	
(mcg)		(mm)		(mcg)		(mm)	
67.5	19.8	21.9	21.1	67.5	18.7	18.6	18.8
45	18.7	20.4	19.6	45	16.7	16.8	17
30	17.2	18.9	18.8	30	14.9	15	15
20	17	17.2	17.4	20	12.9	13	13.1
13.3	14.5	15.7	15.8	13.3	10.9	11	11
r	.92	.97	.91	r	.97	.96	.96
L	14.9	15.7	15.9	L	10.9	11.9	11.8
H	19.9	21.9	21.1	H	18.7	18.6	18.8
Ø	17.2	17.8	18	Ø	14.6	14.6	14.4
<u>Cont</u> Disco				<u>Cont</u> Disco			
Gráfico	27	23	25	Gráfico	28.5	26.5	26.5
Mat.	32.6	26.4	31.5	Mat.	33.6	33.8	31.1

## TECNICA DE REFERENCIA

$$Y = mx + b$$

$$Y = 10.02 (17.2) + (-139.65)$$

$$Y = 8.52 (17.8) + (-125.23)$$

$$Y = 9.05 (18) + (-131.31)$$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

$$Y = mx + b$$

$$Y = 6.86 (14.6) + (-66.54)$$

$$Y = 6.97 (14.7) + (-68.58)$$

$$Y = 6.80 (14.4) + (-66.73)$$

TABLA N° 17 ENSAYO ESTADISTICO DE DOS COLAS.

## TECNICA DE REFERENCIA

ANTIMICROBIANO	Q(Fc)	Q (Fr)
Amikacina	.118262	$1 \times 10^{-10}$
Ampicilina	.009034	$8.9 \times 10^{-6}$
Cloramfenicol	.534197	$8.04 \times 10^{-12}$
Cloxacilina	.057977	$7.6 \times 10^{-7}$
Eritromicina	.00007911	$5.1 \times 10^{-6}$
Gentamicina	.004645	$1.9 \times 10^{-5}$
Lincomicina	.000136	$9.9 \times 10^{-3}$
Penicilina G	.000261	$4.8 \times 10^{-9}$
Tetraciclina	.00155	$1.4 \times 10^{-6}$

## TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE

ANTIMICROBIANO	Q(Fc)	Q (Fr)
Amikacina	.552736	$5.4 \times 10^{-5}$
Ampicilina	.781159	$9.4 \times 10^{-4}$
Cloramfenicol	.2676	$4.3 \times 10^{-5}$
Cloxacilina	.217035	$1.2 \times 10^{-7}$
Eritromicina	.003761	$1.4 \times 10^{-5}$
Gentamicina	.03473	$6.6 \times 10^{-6}$
Lincomicina	.132036	$1.2 \times 10^{-5}$
Penicilina G	.09133	$8.9 \times 10^{-6}$
Tetraciclina	.01444	$4.6 \times 10^{-14}$

DONDE:

Q(Fc) = variación entre los grupos.

Q(Fr) = variación del cont/disco.

TABLA N° 18 PRUEBA T

ANTIMICROBIANO	T	v	P(t)
Amikacina	21.4665	14	1
Ampicilina	26.8726	14	1
Cloramfenicol	16.0966	14	.999999
Cloxacilina	32.9798	14	1
Eritromicina	10.6473	14	.999999
Gentamicina	17.5165	14	1
Lincomicina	4.3885	14	.999690
Penicilina G	13.3680	14	.999999
Tetraciclina	12.0750	14	.999999

DONDE:

t = Frueba t.

v = Grados de libertad

P(t) = Intervalo de confianza

TABLA N° 19 PRUEBA T.

## GRAFICAMENTE

ANTIMICROBIANO	t	v	P (t)
Amikacina	-.307863	2	.393644
Ampicilina	.277350	2	.596225
Cloramfenicol	2.324301	2	.927643
Cloxacilina	-2	2	.091751
Eritromicina	-.102749	2	.463768
Gentamicina	-1.419048	2	.145843
Lincomicina	6.928203	2	.989897
Penicilina G	.359210	2	.623091
Tetraciclina	-3.25	2	.041525

## MATEMATICAMENTE

ANTIMICROBIANO	t	v	P (t)
Amikacina	-.388939	2	.367412
Ampicilina	.809459	2	.748378
Cloramfenicol	3.008058	2	.952487
Cloxacilina	-2.01992	2	.090409
Eritromicina	-.384623	2	.368781
Gentamicina	-.129582	2	.162248
Lincomicina	8.693182	2	.993512
Penicilina G	-1.857142	2	.102206
Tetraciclina	-1.094733	2	.193938

DONDE:

t = Prueba t  
v = Grados de libertad  
P(t) = Intervalo de confianza

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados observados, es posible llegar a establecer curvas con coeficientes de correlación similares en técnicas estadísticamente diferentes, como son: la técnica de referencia y la técnica de siembra en superficie, y, por lo tanto, lograr - valores de contenido por disco similares con todos los antimicrobianos trabajados.

Para un intervalo específico de tiempo de incubación, se observa proporcionalidad en la dosis - respuesta con los antimicrobianos empleados.

No existen diferencias significativas en los métodos gráfico y matemático entre ambas técnicas, con respecto a la cuantificación de contenido por disco en cuanto a los antimicrobianos trabajados, a excepción de Lincomicina, ya que este antimicrobiano es matemáticamente significativo a un nivel de .006.

Las ventajas de la técnica propuesta (siembra en superficie) se hacen evidentes al comparar los parámetros principales con la técnica de referencia; se usa un solo medio de cultivo en lugar de cuatro y únicamente son necesarias dos cepas en lugar de cuatro, por lo que se convierte en una técnica más práctica; es más sencilla dado que se siembra con la misma concentración bacteriana en lugar de buscar la concentración bacteriana más adecuada, y además de las razones antes expuestas, resulta ser más económica.

## CAPITULO V

### ANEXO

FIGURA # 1. MECANISMO DE ACCION DE LOS FARMACOS ANTIMICROBIANOS

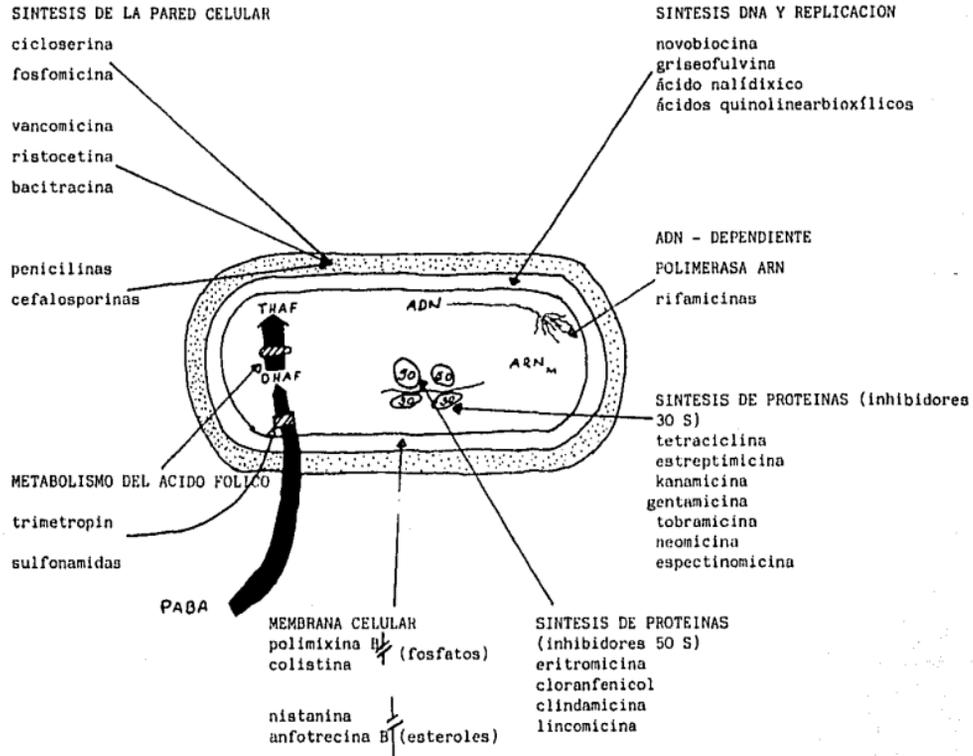


TABLA # 2.- LA EVOLUCION DE LOS ANTIMICROBIANOS.

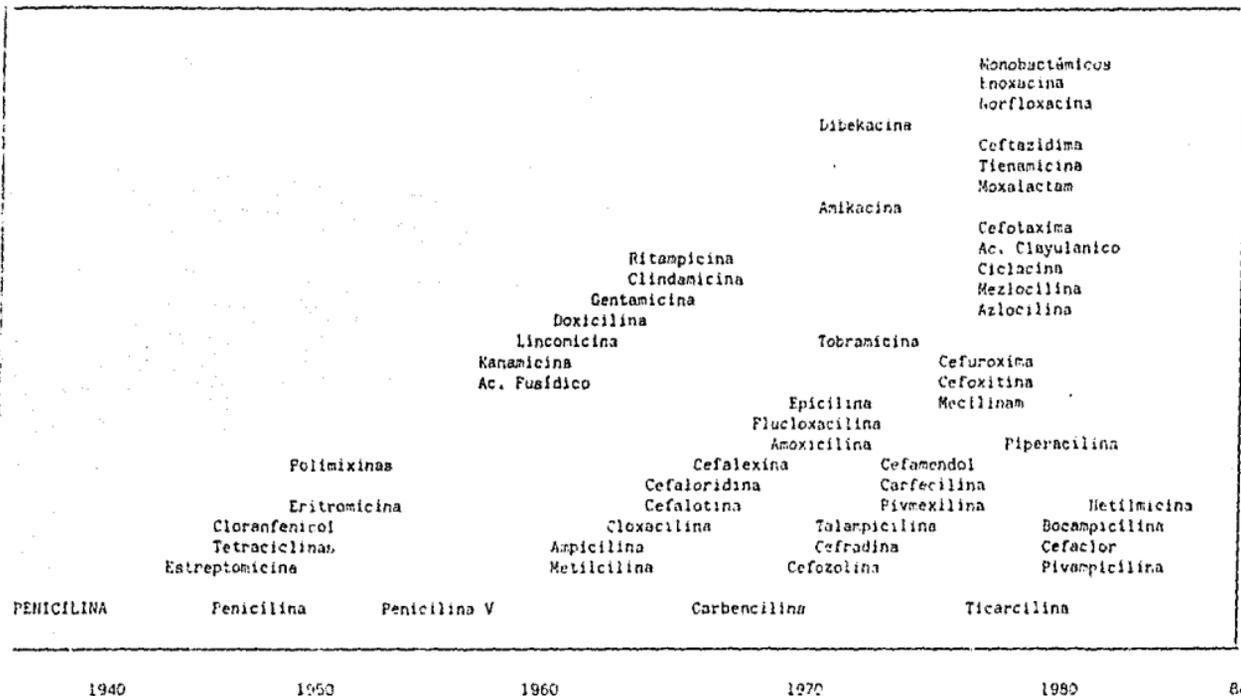


TABLA # 3

## SOLVENTES Y DILUYENTES RECOMENDADOS PARA CADA ANTIMICROBIANO

ANTIMICROBIANO	SOLVENTE	DILUYENTE
Amikacina	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Ampicilina	Buffer PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	Buffer PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>
Cloramfenicol	pH = 8 CH <sub>3</sub> OH	pH = 6 H <sub>2</sub> O
Cloxacilina	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Eritromicina	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH
Gentamicina	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Lincomicina	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Penicilina G	Buffer PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> pH = 8	Buffer PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> pH = 6
Tetraciclina	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

TABLA # 4

POTENCIA Y CONTENIDO / DISCO DE CADA ANTIMICROBIANO

ANTIMICROBIANO	POTENCIA /mcg/mg)	CONT /DISCO (mcg)
Amikacina	915	30
Ampicilina	914	10
Cloramfenicol	100	30
Cloxacilina	894	1
Eritromicina	100	15
Gentamicina	798	10
Lincomicina	863	2
Penicilina G	-	10 unidades
Tetraciclina	968	30

TABLA # 5

CEPAS RECOMENDADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO POR LA F.D.A. EN LA TECNICA DE SIEMBRA EN SUPERFICIE.

ANTIMICROBIANO	CEPA
Amikacina	<u>E. coli</u> ATCC 25 922
Ampicilina	<u>S. aureus</u> ATCC 25 923
Cloramfenicol	<u>E. coli</u> ATCC 25 922
Cloxacilina	<u>S. aureus</u> ATCC 25 923
Eritromicina	<u>S. aureus</u> ATCC 25 923
Gentamicina	<u>E. coli</u> ATCC 25 922
Lincomicina	<u>S. aureus</u> ATCC 25 923
Penicilina G	<u>S. aureus</u> ATCC 25 923
Tetraciclina	<u>S. aureus</u> ATCC 25 923

TABLA # 6

CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS PARA CADA ANTIMICROBIANO EN LA TECNICA DE REFERENCIA.

ANTIMICROBIANO	CEPA	CAPA BASE	CAPA SEMBRADA
Amikacina	<u>S. aureus</u> ATCC 13 150	Medio C	Medio C
Ampicilina	<u>S. aureus</u> ATCC 13 150	Medio E	Medio A
Cloramfenicol	<u>Sarcina lutea</u> ATCC 9 341	Medio E	Medio A
Cloxacilina	<u>S. aureus</u> ATCC13 150	Medio E	Medio A
Eritromicina	<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 14 506	Medio C	Medio C
Gentamicina	<u>S. aureus</u> ATCC 13 150	Medio C	Medio C
Lincomicina	<u>S. aureus</u> ATCC 6 538	Medio A	Medio I
Penicilina G	<u>S. aureus</u> ATCC 13 150	Medio E	Medio A
Tetraciclina	<u>S. aureus</u> ATCC 6 538	Medio E	Medio A

NOTA.- Ver formulaciones de los medios en la Tabla # 7 del anexo.

TABLA # 7

## FORMULACIONES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS POR LA F.D.A. PARA

## LA TECNICA DE REFERENCIA.

## Medio A:

Peptona	6 g
Digerido Pancreático de Caseína	4 g
Extracto de Levadura	3 g
Extracto de Carne	1.5. g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml
pH 6.5 - 6.6 después de la esterilización.	

## Medio C:

Peptona	6 g
Digerido Pancreático de Caseína	4.5 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de Carne	1.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml

## Medio E:

Peptona	6 g
Extracto de Levadura	3 g
Extracto de Carne	1.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml

pH 6.5/6.6 después de la esterilización.

Medio I:

Peptona	6 g
Extracto de Levadura	3 g
Extracto de Carne	1.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml
pH 6.6 después de la esterilización.	

Medio Muller - Hinton:

Infusión de Carne de Res	300 g
Peptona de Caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17 g
Agua Destilada	1000 ml
pH 7.4	

Medio Agar de Soya Trypticaseína:

Peptona de Caseína	17 g
Peptona de Soya	3 g
Cloruro de Sodio	5 g
Fosfato Dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agua Destilada	1000 ml
pH 7.3	

Caldo de Soya Trypticaseína:

Peptona de Caseína	17 g
Peptona de Soya	3 g
Cloruro de Sodio	5 g

Fosfato Dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agua Destilada	1000 ml
pH 7.3	

## CAPITULO VI

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acocella, G.; Hamilton - Miller, J.M.T. y Brumfitt W. Can rifampicin use be safely extended Evidence of non - emergence of resistant - strains of Mycobacterium tuberculosis. Lancet, 1: 740. (1977).
- 2.- Alcid, C.V., and S.J. Seligman. Simplified assay for gentamicin in the presence of other antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 3: 559 - 561. (1973).
- 3.- Bannatyone, R. M. and Cheung, R. Chloramphenicol Biossay. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16; 43 - 45. (1979).
- 4.- Barry, A.L., C.D. Fay and F.W. Athison. Quality control of antimicrobial disk susceptibility testin with a rapid method compared to the standard methods. Antimicrob. Ag. Chemother. 2: 419 - 422. (1972).
- 5.- Barza M, Weinstein L.: Pharmacokinetics of the Penicillina in Man. Clin Pharmacokin 1: 297. (1976).
- 6.- Bauer, A.W. Kirby. W.M.M. Sherris. J.C. and Turck M.: Antibiotic Susceptibility Testing by a Standarized Single Disk Method. Am. J. Clin Pathol. 45: 493. (1966).
- 7.- Beam. T.R. Jr.: Recent developoment in antimicrobial Therapy with Betalactam Antibiotics. J. Med. 14 (4): 307 - 36. (1983).
- 8.- Bear. D.: Turck., M. y Petersdorf. R.G.: Ampicillin. Med. Clin. N. Am. 54 1145. (1970).

- 9.- Benvesniste, R., and J. Davies, structural-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics; role of hidroxil and amino group. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 4: 402 - 409. (1973).
- 10.- Bergamini N., y Fowst G.: Rifamycin S.V.A. review. *Arzeimit - Forsch.*, 15: 933. (1965).
- 11.- Blazevic, D.J., M.H. Koepcke, and J.M. Matsen; Quality control testing with the disk antibiotic susceptibility test of Bauer-Kirby-Sherris-Turck. *Amer J. Clin Pathol.* 57: 502 - 507. (1972).
- 12.- Breen, K.J., et. al.: Neomycin absorption in man. *Ann. Int. Med.* 76. 211. (1972).
- 13.- Brock, T.D.: Chloramphenicol. *Bact. Revs.*, 25: 32. (1961).
- 14.- Brogard, J.M. Pinget, M.; Dorner, M. y Lavillieix J.: General - Characteristics of cephalosporin derivatives; comparative pharmacology. *Future Trends in Chemotherapy.* 21. (1974).
- 15.- Bull WHO Control of antibiotic resistant bacteria: memorandum from a WHO meeting. 61 (3): 428 - 33. (1983).
- 16.- Bunn. P.A., Kanamycin. *Med. Clin. N. Am.*, 54: 1305. (1970).
- 17.- Burnet, M. *Natural History of Infections Diseases.* 4a. ed., Cambridge, Cambridge University Press. (1972):
- 18.- Cook. F.V. y Farra, W.E.: Vancomycin revisited. *Ann. Int. Med.*, 88: 813 (1978).

- 19.- Cooper, K.G. and W.A. Gillespie. (1952) The influence of Temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. J. Gen. Microbiol. 7: 1 - 7. (1952).
- 20.- Cox, C.E.: Gentamycin. Med. Clin. N. Am., 54: 1305. (1970).
- 21.- Chamberlain, R.E.. Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans. J. Antimicrob. Chemother., 2: 325, (1976)
- 22.- Davies, W.W., and Stant. T.R. Disk plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. Appl Microbiol. 22: 659-665. (1971).
- 23.- Editorial; Amikacin, Lancet, 1: 891, (1977).
- 24.- Ellis, C.J. et. al.. Mezlocillin and Azlocilin: An evaluation of two new beta lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother 5: 517. (1979).
- 25.- Ericsson, H.G., and J.C. Sherris. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol. Scand. Sect. B. Suppl. 217. (1971).
- 26.- Ericsson, H.G., Tunewall, and K. Wickman. The paper disk method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics. Relationship between the diameter of the zone and the minimum inhibitory concentration. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12:414. (1960).
- 27.- Fass, R.J., R.B. Prior, and C.A. Rotilie, Simplified method for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrob. Agents Chemoter. 8: 444-452. (1975).

- 28.- Feingold, D.S., Msu-chen, C. Sudd, I.J.. Basis for de selectivity of action of the polymyxin antibiotics on cell membranes. Ann. - N.Y. Acad. Sci. 235: 480. (1974).
- 29.- Fishman, L.S., and Hewitt, W.L.. The natural penicillins. Med. Clin N. Am., 54: 1081. (1970).
- 30.- Flandrois, J.P. et. al.. Evaluation of a rapid technic for antibiotic sensitivity testing: Reproducibility of minimal inhibitory concentrations routinely estimated with the use of Abbot Ms-2 Autoanalyzer. Ann. Biol. Clin. 41 (1): 55-60. (1983).
- 31.- Food and Drug Administration. Antibiotics intended for use in the laboratory diagnosis of disease. Fed. Regist. 37: 20525-20529. (1972).
- 32.- Gale, E.F., et. al.. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley and sons, London. 456. (1972).
- 33.- Garrod, L.P., Lambert, H.P., and O'grady F. Antibiotic and Chemotherapy four ed. Churchil Livinstone. Edimburgh. 546. (1973).
- 34.- Gerber, A.V.. Microbiologic principles of antibiotics therapy. Sheweiz Med Wochenschr. 14: 114(15): 506-74. (1984).
- 35.- Habwe, V.,y Shadomy, S.. Comparative in vitro studies with -- netilmicin, amikacin, gentamycin, sisomycin and tobramycin. J. Antimicrob. Chemoter. 5: 73. (1979).

- 36.- Hausser, K.J., J.A. Johnston, and P.J. Zabransky. *Economical Antimicrob. Agents Chemoter.* 7: 712-714. (1975).
- 37.- Humprey. J.J., and J.W. Leightbown. A general theory for plate assays of antibiotics with some practical applications. *J. Gen. Microbiol.* 7: 29-143. (1952).
- 38.- Hyanes, M. S. Simberkoff, and J.J. Rahal Jr. In vitro Bactericida leffectiveness of four aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. and Chemoter.* 3: 87-94. (1973).
- 39.- Jones, R.N. Antimicrobial susceptibility testing (AST): a review of changing trends quality control guidelines, test accuracy and recommendation for the testing of beta lactam drugs. -- *Diagnostic Microbiol Infect Dis.* 1 (1): 1-24. (1983).
- 40.- Kelly, R.S., Hunt, A.D., Tashman. S.G.. Studies on the absorption and distribution of chloramphenicol. *Pediatrics.* 8: 362. (1951).
- 41.- Knohe, H. Dette, G.A.. Pharmacokinetics of erythromycin. *Scott Med. J.* 22: 397. (1977).
- 42.- Kosek, J.C. Nephotoxicity of gentamycin *Laboratory Invest.* -- 30-48. (1974).
- 43.- Kucers, A.. Current position of chloramphenicol chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 6:1. (1980).
- 44.- Kucers, A. Nitrofurantoin. "The use of antibiotics". Londres W. Heinemann Medical Books. Ltd. pp. 359. (1972).

- 45.- Kucers, A. Sulphonamides. "The use of antibiotics". Londres W. Heinemann Medical Books Ltd. p. 309. (1972)
- 46.- Kucers, A. Polipeptides. "The use of antibiotics". Londres W. Heinemann Medical Books. Ltd. p. 236. (1972).
- 47.- Kimnain, C.M.. Antibiotic resistance a world health problem we cannot ignore. Ann. Intern. Med. 99(6); 859-860. (1983).
- 48.- Lennete, E.H. Spaulding, and J.P. Truant. Manual of Clinical Microbiology. 3rd. ed. American Society for Microbiology. -- Washington, D.C. (1980).
- 49.- Lester, W.. Rifamping, A semishintetic derivative of rifamycin Ann. Rev. Microbiol. 26: 85. (1972).
- 50.- Levy, S.B.. Antibiotic resistance. Infect Control. 4 (4); 195-197. (1983).
- 51.- Mallow, J.B. et.al.. Comparative in vitro activity of Bay K - 4999 and piperacillin. J. Antimicrob. Chemoter. 5: 407. (1979).
- 52.- Martin, W.J.. The present status of streptomycin in antimicrobialtherapy. Med. Clin. N. Am.. 54: 1161. (1970).
- 53.- Mates. A simple devices for measuring antibiotic zone inhibition Microbios. 38 (151): 43-9. (1983).
- 54.- Mathi, J. E.. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures, Antimicrob. - Agents Chemoter. 10: 211-214. (1982).

- 55.- Matsen, J.M., M.J.H. Koepce, and P.G. Quie. Evaluation of the Bauer Kirby/Sherrys /Truck single-disk diffusion method of antibiotic susceptibility testing. p. 445-453. Antimicrob. Ag. - Chemoter. (1970).
- 56.- Mc. Cormac, V.M.. and Finland, M.. Spectinomycin. Ann. Int Med.. 84: 712. (1979).
- 57.- Mc. Kendrick, M.W.. Erythromycin revisited. J. Antimicrob, Chem ther.. 5: 495. (1979).
- 58.- Mc. Nelll., W.H.. Plagues and peoples. Garden City. Another books. (1976).
- 59.- Meyer, R.D., Lewis, R.P., Duane Carmalt, E., and Finegold, S.M. Amikacin therapy for serious gram negative bacillary infections. Ann. Int. Med. 83: 790. (1975).
- 60.- Neuman, M.. The cephalosporins. Future trends in chemotherapy. 11. (1974).
- 61.- Noone, P.J.R., Pattison, and D, Samson. Simple, rapid method for assay of aminoglycoside antibiotics. Lancet. 2: 16-19. (1971).
- 62.- Ory, E.M.. The tetracyclines. Med. Clin. N. Am.. 54: 1173. (1970).
- 63.- Pratt, W.B.. Fundamentals of chemotherapy. Londres.Oxford University Press. (1973).
- 64.- Rao, V.S. et.al. Conformation and activity of betalactam antibiotics Crit. Rev. Biochem. 14 (3): 173-206. (1983).

- 65.- Revised Tentative Standard. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test, as uses in clinical laboratories. National Committee for Clinical Laboratories. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Los Angeles. (1973).
- 66.- Riva, S. and Silvestri, L.G.. Rifamycins: A general view. *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 199. (1972).
- 67.- Rotilie, C.A., R.J. Fass, R.B. Prior, and R.L. Perkins. Micro-dilution technique for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 7: 311-315. (1975).
- 68.- Ryan, K.J., Schoenknecht, F.D. and Kirby. W. M. W.: Disk sensitivity testing. *Hosp. Pract.* 5: 91. (1970).
- 69.- Sanford, Jay. Guide to antimicrobial therapy. U.S.A. p. 38. -- (1986).
- 70.- S. Selwyn, J. *Antimicrob. Chemother.* 9 suppl. 8, 1. (1982).
- 71.- Simposio. Symposium of carbencillin. A clinical profile. *J. Infect. disk.* 122 suppl. (1970).
- 72.- Smith, D.H., B. Van Otto, A.L., Smith, A. Rapid chemical assay for gentamicin *N. Engl. J. Med.* 286: 584. (1972).
- 73.- Stempler, J.E., and Matsen, J.M. Matsen. Device for turbidity standardization of cultures for antibiotic sensitivity testing. *Appl. Microbiol.* 19: 1015-1016. (1970).
- 74.- Stokes, E.J.. *Clinical Bacteriology.* Ed. 3 p. 179. London. Edward Arnolds and Co. (1968).

- 75.- Storm, D.R. , Rosenthal, K.S. , and Swanson, P.E. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* 46:723.(1977).
- 76.- Stroy, S.A. Modified microbiological assay for rapid estimation of antibiotic concentrations in human sera. *Appl. Microbiol.* 18: 31 - 34. ( 1969 ).
- 77.- Szybalsky, W. Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science.* 116:46. (1952 ).
- 78.- United State Department of Health Education and Welfare, Food and Drug Administration. Antibiotic Susceptibility Disk. Federal Register. 37 : 20525. ( 1972 ).
- 79.- Washington, J.A.. Laboratory procedures in clinical microbiology. Boston. Little Brown Pu. (1974).
- 80.- Wayne, L.G. and Krasnow, I. Preparation of tuberculosis susceptibility testing mediums by means of impregnated disk. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 769-771. (1966).
- 81.- WHO Expert Comitee on Antibiotics: Second Report: Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests. WHO Technical report series N<sup>o</sup> 210. (1961).
- 82.- Weidemann, B. . Development of resistance following the use of antibiotics *Scand J. Gastroenterology.* 90: 21-7 (1978).
- 83.- Wilkins, T.D., and Thiel. Modified broth disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3: 350-356. (1973).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 84.- Weinstein, L., Madoff, M.A., and Samet, C.M.. The sulfonamides. New Eng. J. Med., 263: 793, 842, 900, 952. (1960).
- 85.- Weisberger, A.S.. Mechanism of action of chloramphenicol. J.A.M.A. 209, 97. (1969).
- 86.- Wright, I.. Investigation of ototoxicity of an antibiotic from Micromonospora purpúrea (gentamycin). J. Path., 98: 129. (1960).