

24/106

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**COMPARACION ESTADISTICA DE METODOS
MICROBIOLÓGICOS PARA DETERMINAR
POTENCIA DE AMPICILINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ARMANDO SALDAÑA MAURICE

México

1989

**TESIS CON
FALTA DE CRÉDITO**



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.

C O N T E N I D O

	Pag.
OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	2
I GENERALIDADES	5
1. Teoría de la formación de las zonas de inhibición	
1.1. Las leyes de difusión	5
1.2. Concentración crítica	7
1.3. Tiempo crítico	7
1.4. Población del inóculo	8
1.5. Población crítica	8
1.6. Población inhibitoria	11
1.7. Naturaleza de la zona de inhibición	12
1.8. Factores que influyen en el tamaño de las zonas de inhibición	14
II PARTE EXPERIMENTAL	17
2.1. Plan de trabajo	17
2.2. Material	
2.2.1. Equipo	17
2.2.2. Material de vidrio	18
2.2.3. Medios de cultivo y reactivos elaborados	18
2.2.4. Muestras a analizar	18
2.2.5. Material biológico	18
2.3. Metodología	
2.3.1. Microorganismo de prueba	19
2.3.2. Preparación del inóculo	19
2.3.3. Colocación de los cilindros	19
2.3.4. Preparación de las placas	19

2.3.5. Cantidad de inóculo	19
2.4. Ensayos de prueba	
2.4.1. Ensayo de un nivel con curva estándar	20
2.4.2. Diseño 2 + 2. Ensayo factorial de dos niveles	22
2.4.3. Diseño cuadrados latinos 6 x 6	26
III ANALISIS ESTADISTICO	27
IV DISCUSION	42
V CONCLUSIONES	46
ANEXO	47
VI BIBLIOGRAFIA	48

OBJETIVOS

- Comparar el método tradicional de curva estándar (diseño 5+1) con los diseños 2+2 y 6x6, realizando un análisis estadístico.

- Concluir qué método ofrece mayores ventajas o si no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos.

- Permitir la elección del método que pueda reunir entonces, factores ventajosos como economía, número de muestras a analizar y tiempo de análisis.

INTRODUCCION

Un antibiótico se define, por lo general como una sustancia química, producto del metabolismo secundario de un microorganismo, que es capaz de matar o inhibir el desarrollo de otros microorganismos (4).

Los antibióticos interfieren con el crecimiento y multiplicación de bacterias susceptibles, esta interferencia puede llevarse a cabo por diferentes caminos, lo cual no es extraño puesto que los antibióticos tienen diferentes grupos químicos que interactúan con los componentes celulares dando por resultado la actividad antimicrobiana. De esta forma los antibióticos pueden agruparse de acuerdo al sitio de la célula que atacan. Los principales sitios de acción son: pared celular, membrana, metabolismo, síntesis de proteínas y replicación del ácido nucleico (4) (12) (16).

Durante largos años, se supo que los microorganismos podían a veces combatirse unos con otros. El fenómeno ya se había señalado en 1874, y lo mencionaban Pasteur y Joubert en 1877, en que mostraron que se destruyó el bacilo del ántrax cuando el cultivo se contaminó con otras bacterias. En 1940 Chain y colaboradores usaron zonas de inhibición para determinar la actividad de la penicilina que aislaron y purificaron, esto sugirió la idea de que el tamaño de la zona fuera la base para una comparación cuantitativa con una penicilina de referencia. Abraham y colaboradores y Foster y Woodruff investigaron muchos de los factores que influyen en los resultados y compararon las ventajas y desventajas del método de difusión en agar con el turbidimétrico. En el año de 1946 Cooper y Woodman publicaron un trabajo en donde exponían los aspectos teóricos incluidos en los métodos de difusión (10) (14).

Durante los últimos 40 años, la obtención de antibióti-

cos se ha desarrollado rápidamente y sin duda esto puede deberse a que se ha contado con métodos adecuados, en donde se han cuantificado las sustancias antimicrobianas durante el proceso de purificación.

Los métodos microbiológicos pueden conducir a un mayor error que los métodos químicos, pero si al primero se le dan las condiciones óptimas para que tanto el microorganismo como el antibiótico y sus factores inherentes al ensayo sean los más idóneos, se logrará una mayor sensibilidad que la que se obtiene por el químico, por lo que el resultado microbiológico es concluyente. Más adelante se discutirán estas condiciones, por el momento se resumirán las siguientes (12):

a) La composición del medio nutritivo debe establecerse muy bien, ya que algunos de los componentes pueden afectar a ciertos antibióticos, lo que ha llevado al desarrollo de medios exclusivos para el ensayo de éstos. La profundidad del medio y el grado de hidratación del gel de agar también deben establecerse.

b) La cantidad de inóculo debe ser constante, así como la velocidad de crecimiento, si el inóculo es grande, las zonas de inhibición pueden no ser claras. Los ensayos de los antibióticos se deben llevar a cabo con cepas microbianas específicas, de sensibilidad antibiótica conocida (por lo que se recomienda obtener cepas de colecciones microbianas de referencia).

c) El tiempo de incubación y la temperatura deben ser constantes, ya que estos dos factores afectan la difusión del antibiótico y la velocidad de crecimiento del microorganismo. Si el período de incubación es largo, puede ocurrir crecimiento dentro de las zonas de inhibición.

d) Para resultados exactos el ensayo debe repetirse varias veces y el diámetro de las zonas producidas comparado estadísti

camente con concentraciones conocidas del antibiótico que se utilice como referencia.

Al cumplir con estas condiciones se obtiene un buen ensayo y se determina que el diámetro de la zona de inhibición alrededor del depósito de antibiótico es proporcional al log ritmo de la concentración del mismo.

I GENERALIDADES

1. Teoría de la formación de las zonas de inhibición.

El método de difusión en agar empezó a emplearse cuantitativamente a partir de los trabajos hechos por Chain y co laboradores en 1940, al introducir estos ensayos en los procesos de purificación de la penicilina.

El sistema en general comprende: un medio de agar nutritivo inoculado con una suspensión del microorganismo de prueba en la forma vegetativa (o de spora), la suspensión se hará a partir de un microorganismo incubado para lograr la fase lag (o en el caso de utilizar un microorganismo esp ru la d o m a s u l a d e l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g o e n e l c a s o d e u t i l i z a r u n m i c r o o r g a n i s m o e s p u r u l a d o l a f a s e l a g

donde D es la constante de proporcionalidad que se define como el coeficiente de difusión. Esta es una representación matemática de la ley de Fick.

La velocidad de difusión a través del agar depende de la concentración de antibiótico en el depósito, el tamaño y la forma de la molécula del antibiótico, la viscosidad del agar, la temperatura y de otros agentes como el contenido iónico del medio. Para un antibiótico determinado, la velocidad de difusión en un medio definido bajo condiciones de prueba controlados puede determinarse experimentalmente y expresarse como una constante (coeficiente de difusión). En condiciones de prueba óptimas, la distancia alcanzada por una concentración particular de un antibiótico en un período de tiempo dado es proporcional a la cantidad de antibiótico en el depósito (2).

Una vez que la difusión ha empezado, se inician dos procesos simultáneamente, en el primero, la difusión del antibiótico en forma radial a partir del depósito, produce un gradiente de concentración que cambia gradualmente. Al mismo tiempo, el microorganismo empieza a metabolizar y después de la fase lag inicial, el crecimiento prosigue a una velocidad logarítmica (2).

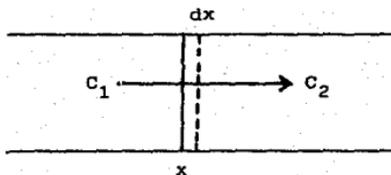


Fig. 1 (14).

1.2. Concentración crítica m' . La concentración del antibiótico llega a la posición de la futura zona limitante a un cierto tiempo, durante el cual la concentración crítica inhibitoria puede difundir en el agar antes que se alcance una densidad particular de células. Esto depende del coeficiente de difusión del antibiótico y la concentración del mismo que haya en el depósito. La concentración crítica es una medida de la sensibilidad del microorganismo de prueba bajo las condiciones particulares del ensayo. La concentración crítica es diferente a la concentración crítica inhibitoria, siendo de dos a cuatro veces más grande la primera que la segunda y se determina bajo diferentes condiciones. Se define matemáticamente por:

$$\ln m' = \ln m_0 - Y^2 / 4 D T_0$$

donde D es el coeficiente de difusión (expresado en mm/hr), el cual, depende de la temperatura y de la viscosidad del medio y varía inversamente al radio de la molécula, m_0 es la concentración inicial del antibiótico, Y es la distancia del límite del depósito al fin de la zona de inhibición, T_0 es el tiempo crítico y m' la concentración crítica (13).

1.3. Tiempo crítico T_0 . El tiempo crítico es el período de crecimiento del microorganismo al cual llega la población crítica N' . Es el tiempo donde se fija el borde de la zona y puede determinarse por preincubación del medio inoculado, variando períodos antes de la adición de la solución del antibiótico en el depósito. Se define matemáticamente por:

$$T_0 = h - Y^2 / 4 D \ln (m_0 / m')$$

donde h es el tiempo de preincubación y D , Y , m_0 y m' tienen el mismo significado que se dijo anteriormente. El tiempo crítico depende de la fase lag (L) y del tiempo de generación (G), por lo tanto, depende de la temperatura y del inóculo N_0 (población de inóculo). Es independiente de la concentración del antibiótico (13).

1.4. Población del inóculo N_0 . Es la población al tiempo del inóculo.

1.5. Población crítica N' . Es la población al tiempo T_0 , un incremento adicional en la población más allá de este límite da como resultado un exceso de microorganismos capaces de absorber completamente el antibiótico y así impedir su difusión adicional. La difusión del antibiótico durante la fase lag de crecimiento puede dar como resultado zonas de inhibición pequeñas, más aún si se usó un inóculo grande tal como $N_0 = N'$.

Después de la inoculación, el microorganismo inmediatamente empieza a crecer. Después de la fase lag, que es la inicial, el microorganismo pasa a la fase logarítmica y la multiplicación prosigue rápidamente. El punto se alcanza cuando la masa celular es lo bastante grande para no ser inhibida por la concentración crítica del antibiótico. Este crecimiento sigue hasta llegar a ser visible, limitando el borde de la zona de inhibición. La relación entre tiempo crítico (T_0) y el crecimiento del microorganismo, puede expresarse por la siguiente fórmula:

$$T_0 = L + G \log_2 (N' / N_0)$$

donde L es el tiempo de la fase lag, G el tiempo de generación, N' la población crítica al tiempo crítico (T_0) y N_0 el

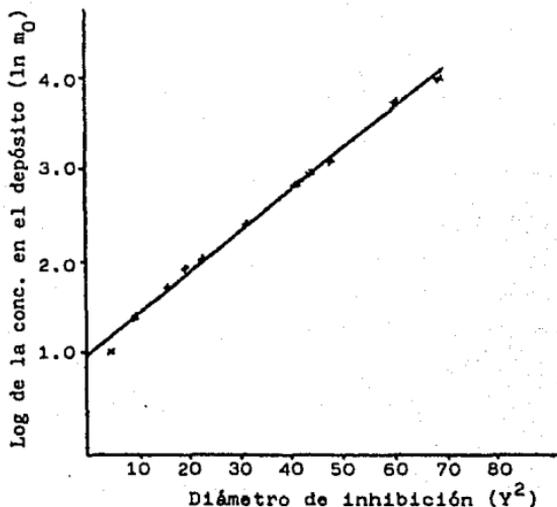


Fig. 2. La relación entre el diámetro de la zona de inhibición al cuadrado Y^2 , y el logaritmo de la dosis aplicada de estreptomicina ($\log M_0$) en tubos con agar inoculados con Staphylococcus. La concentración crítica m' corresponde al punto de intersección de la línea de respuesta con la escala del logaritmo de la dosis. Así, la concentración crítica se obtiene como el antilog $0.95 = 8.9$ mcg/ml (13).

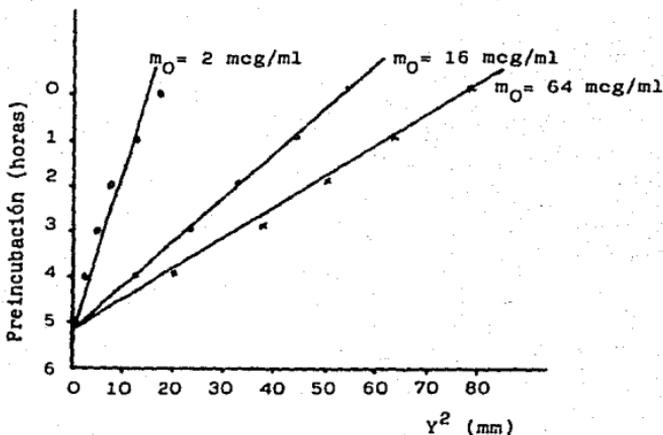


Fig. 3. La gráfica muestra la determinación del tiempo crítico T_0 . Las tres líneas corresponden a tres concentraciones diferentes de un mismo antibiótico graficadas a partir del diámetro de la zona de inhibición al cuadrado contra el periodo de preincubación, todas las líneas intersectan el mismo punto correspondiente a $Y^2 = 0$. Esto demuestra que el tiempo crítico es independiente de la dosis de antibiótico y que en estas condiciones experimentales (microorganismo de prueba, cantidad de inóculo, medio y temperatura de incubación) es de 5.4 horas. La gráfica se hizo utilizando estreptomicina y Staphylococcus (13).

número de células vivas al tiempo 0 (densidad del inóculo).

A partir de esta relación, es claro que el tiempo crítico T_0 , se determina por el tamaño del inóculo y la velocidad de crecimiento del microorganismo. La densidad del inóculo es una variable importante que puede y debe ser controlada para obtener resultados adecuados. La velocidad de crecimiento de las cepas de prueba es influenciada por el tamaño del inóculo y por la capacidad nutritiva del medio de cultivo de prueba. Un medio que ofrece un crecimiento rápido del microorganismo no es deseable debido a que las zonas de inhibición son reducidas. Por otra parte, un medio con nutrientes mínimos exhibe un crecimiento lento que tiende a dar grandes zonas de inhibición (2) (13).

1.6. Población inhibitoria N'' . Es aquella población suficientemente grande que impide completamente la formación de zonas de inhibición. Los factores que deciden el límite de la zona son la concentración crítica y la población crítica. Los factores que influyen en la difusión del antibiótico o el tiempo que es necesario para alcanzar la población crítica, afectará el tamaño de la zona.

Debe observarse que de acuerdo con la teoría de la formación de la zona de inhibición, la pendiente de la línea de respuesta se determina por los siguientes factores (2) (13):

- 1) preincubación
- 2) predifusión
- 3) temperatura de incubación

Con respecto al último punto cabe hacer mención que el coeficiente de difusión aumenta con la temperatura, mientras que la velocidad de crecimiento se incrementa a un óptimo y

luego cae.

Un inóculo bajo permite zonas grandes y una pendiente mejor de la línea de respuesta del logaritmo de la concentración. Sin embargo, si la cantidad de inóculo se reduce, el límite de la zona es difuso. Deben hacerse ensayos para seleccionar la cantidad del inóculo que de zonas con límites claramente definidos y con una buena pendiente de la línea de respuesta del logaritmo de la concentración.

1.7. Naturaleza de la zona de inhibición. En las secciones anteriores se habló de la presencia de un gradiente de concentración del antibiótico, en donde, el crecimiento microbiano va a presentar dos formas de inhibición, una completa y otra parcial y, de esta forma, el borde de la zona de inhibición se demarca exactamente. En la práctica, la mayoría de los antibióticos producen una zona de inhibición parcial, en donde a veces es difícil visualizar el límite. Para comprenderlo mejor, el siguiente dibujo muestra en forma exagerada el borde de la zona de inhibición (2) (15).

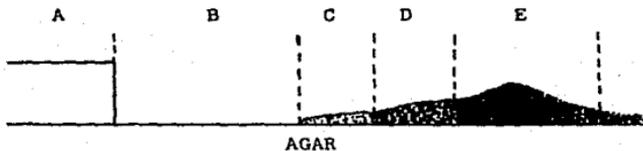


Fig. 4. A) depósito, B) inhibición completa, C) inhibición parcial, D) crecimiento retardado y E) crecimiento estimulado (2).

El área de crecimiento estimulado puede atribuirse a un crecimiento disminuido de la parte que está más cerca del depósito, debido a que los nutrientes que difunden de la zona de inhibición son más fácilmente utilizables para las células que se encuentran al borde de la zona y así la masa de crecimiento es algo más grande. Este fenómeno probablemente no está relacionado a un efecto estimulante de concentraciones subinhibitorias de antibiótico en el medio. Una banda de inhibición parcial es usualmente muy estrecha y probablemente representa una breve inhibición y un eventual crecimiento que es frecuentemente observado con concentraciones subinhibitorias de antibiótico. Uno podría esperar encontrar la concentración inhibitoria dentro de esta banda de inhibición parcial, así el crecimiento sería completamente inhibido. A veces hay otro anillo interno muy débil, de crecimiento retardado, que representa células vivas inicialmente inhibidas por la concentración del antibiótico. Este fenómeno puede relacionarse frecuentemente con la degradación o inactivación del antibiótico resultando un crecimiento retardado de estas células vivas capaces de sobrevivir la concentración inhibitoria inicial. Esta respuesta es particularmente notable en microorganismos de prueba que producen una enzima extracelular, tal como la penicilinasasa o β -lactamasa de S. aureus (2).

Cuando el inóculo contiene una pequeña proporción de variantes resistentes, éstas eventualmente crecen para producir colonias visibles dentro de la zona de inhibición. La población inicial de células resistentes puede ser relativamente pequeña, resultando colonias de menor tamaño y de lenta formación, regularmente es el área cercana al depósito, donde la concentración del antibiótico es alta. Para distinguir entre crecimiento secundario de variantes resistentes y crecimiento retardado de sobrevivientes susceptibles, deben de subculti-

varse colonias del área de inhibición y repetir el ensayo. De esta manera se incrementaría la proporción de variantes resistentes y así el ensayo repetido sería definitivo. Por supuesto, es siempre necesario distinguir microorganismos contaminantes de variantes resistentes (2).

1.8. Factores que influyen en el tamaño de las zonas de inhibición. A partir de las secciones anteriores se ha comentado la variedad de factores técnicos que influyen en el tamaño de las zonas de inhibición. Algunos pueden afectar los resultados en varias formas. Las variables más importantes que son fácilmente sujetas a control experimental son las siguientes (2) (13):

a) Sensibilidad primordial del microorganismo de prueba.

b) Condición del microorganismo de prueba. Vegetativo o esporá, si es vegetativo su fase de crecimiento.

c) Densidad del inóculo. La cantidad es probablemente la variable más importante que influye en las zonas de inhibición. El tamaño de la zona no se determina hasta que se alcanza la población crítica (N'). Con un inóculo pequeño se requiere de más tiempo para alcanzar la población crítica y así, el antibiótico puede difundir más y la zona es más grande. El tamaño de la zona se relaciona inversamente con la cantidad de inóculo.

d) Composición del medio. Este influye en el tamaño de la zona por tres razones:

1) su efecto en la actividad del antibiótico

2) su influencia en la velocidad de difusión del antibiótico

3) su efecto en la velocidad de crecimiento del microorganismo.

La capacidad nutritiva del medio puede tener una influencia significativa en la duración de la fase lag y el tiempo de generación del microorganismo. Un medio deficiente produce zonas más grandes, probablemente debido a la prolongación de la fase lag que se requiere antes de que pueda iniciarse el crecimiento. El contenido de agua del medio es importante, debido a que la pérdida de la misma ocasiona que las zonas que se encuentran a los bordes de las placas grandes sean de mayor tamaño que las que están al centro de la placa.

e) Incremento del grosor del medio. Lo cual ocasiona disminución del diámetro de la zona.

f) Concentración de la solución de prueba.

g) Volumen de la solución de prueba que se aplica a la placa. Este debe ser grande, de tal forma que actúe como depósito con una concentración continua o aplicando un volumen igual.

h) Área de aplicación de la solución de prueba. Debe existir uniformidad en cuanto al área de contacto entre depósito y capa inoculada, ya sea que se utilicen cilindros de acero inoxidable, perlas de porcelana o discos de papel. En el caso de perforaciones en el agar, el diámetro debe ser constante.

i) Tiempo de aplicación de las soluciones de prueba. Las soluciones aplicadas al último tienen menos tiempo para difundir, por lo que la población crítica se alcanza en menos tiempo

produciéndose zonas más pequeñas.

j) Temperatura de incubación. Una placa colocada en el entrepaño de la incubadora tarda una hora para calentarse 1°C de la temperatura del incubador, pero si las placas se colocan en columnas de cinco, la placa del centro tarda cerca de 4 horas para alcanzar esa misma temperatura. Debido a que la velocidad de crecimiento del microorganismo de prueba es más baja si no se alcanza la temperatura óptima, el tiempo que se requiere para alcanzar la población crítica será más largo. Consecuentemente, las placas del centro de la columna tendrán zonas más grandes que aquéllas que están abajo, debido a que la concentración crítica del antibiótico tiene más tiempo para difundir.

k) Tiempo de incubación. La posición de la zona de inhibición se determina en las primeras horas de incubación, las zonas pueden medirse tan pronto como el crecimiento microbiano llega a ser visible.

II PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Plan de trabajo

Se realizaron 30 ensayos divididos de la siguiente manera: 20 análisis en donde se estableció la potencia estimativa al 100%, 5 al 90% y los 5 restantes al 110% con respecto a la muestra de referencia. Se hizo en dos muestras, las cuales provienen de diferente proveedor para tener una base más amplia en el análisis estadístico.

Como muestra de referencia se usó ampicilina trihidratada que previamente se valoró con un estándar primario USP. Cabe citar que ambas muestras ensayadas son trihidratadas y los tres métodos se efectuaron el mismo día y se evitó cualquier cambio que pudiera haber favorecido alguno de los métodos.

2.2 Material

2.2.1 Equipo

- Estufa de incubación modelo Blue-M cuya exactitud es de 0.5°C, con un rango de temperatura hasta de 65°C.
- Espectrofotómetro Coleman Junior II modelo 6/20.
- Antibiotic Zone Reader con una aproximación de 0.1 mm para la medición de las zonas de inhibición.
- Vernier con una aproximación de 0.05 mm para la lectura de las zonas en el método de cuadrados latinos.
- Cilindros de acero inoxidable con las siguientes dimensiones, teniendo cada una de ellas una tolerancia de ± 0.1 mm, diámetro exterior 8.0 mm, diámetro inferior 6.0 mm y de altura 10.0 mm.

2.2.2 Material de vidrio

- Cajas de Petri (20 x 100) con tapa de porcelana porosa.
- Refractorio PYR-O-REY (20 x 20) para el diseño de cuadrados latinos.
- Matraces volumétricos de 200, 100, 25 y 10 ml.
- Pipetas volumétricas de 1 ml.
- Pipetas de 2 ml graduadas en centésimas (1/100).
- Pipetas graduadas de 25 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 1000 y 250 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Botella de Roux.
- Tubos de ensayo de diferentes medidas.

2.2.3 Medios de cultivo y reactivos

- Agar antibiótico No 1 (Merck 5272).
- Agar antibiótico No 11 (Bioxon 243).
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.0 ± 0.1.
- Solución salina isotónica.

Los medios de cultivo como la solución amortiguadora son los descritos por la USP (18).

2.2.4 Muestras a analizar

- Ampicilina trihidratada. Las dos muestras se mantuvieron en un desecador y se hicieron las diluciones apropiadas para obtener las siguientes concentraciones: 0.064 mcg/ml, 0.080 mcg/ml, 0.100 mcg/ml, 0.125 mcg/ml y 0.156 mcg/ml.

2.2.5 Material biológico

- Sarcina lutea ATCC 9341 como microorganismo de prueba, adquirido en la SSA.

2.3 Metodología

2.3.1 Microorganismo de prueba

- El cultivo se mantiene en tubos inclinados y debe transferirse semanalmente a cultivos frescos.

2.3.2 Preparación del inóculo

- A un cultivo fresco de 24 horas se le agrega solución salina isotónica estéril y con ayuda de perlas de vidrio se suspende el crecimiento. Debe de obtenerse una suspensión que diluyéndola 1:40, dé 25% de transmitancia a una longitud de onda de 580 nm.

2.3.3 Colocación de los cilindros

- Para el diseño 5 + 1 y 2 + 2 se colocaron 6 cilindros dejando un espacio de aproximadamente 28 mm entre cada cilindro, de tal manera que se forme un ángulo de 60° entre los cilindros y el centro de la caja. Para el diseño de cuadrados latinos se colocaron 36 cilindros dejando un espacio de aproximadamente 28 mm.

2.3.4 Preparación de las placas

- A las cajas Petri se les agregó 21 ml para la capa basal y 4 ml para la capa inoculada. En la de cuadrados latinos la capa basal fué de 110 ml (se le adicionó 0.1 g de agar para darle mayor consistencia), y la capa inoculada fué de 21 ml.

2.3.5 Cantidad de inóculo

- 1 ml de la suspensión preparada a 25% de transmitancia, por cada 100 ml de medio de cultivo. La suspensión se adiciona al medio teniendo éste una temperatura cercana a los

50° C. Es importante esta indicación debido a que una mayor temperatura o un tiempo prolongado del microorganismo en el agar fundido incrementan la destrucción de enzimas dando por resultado un tiempo de generación mayor.

2.4 Ensayos de prueba

2.4.1 Ensayo de un nivel con curva estándar

Este método es el que se usa con mayor frecuencia en la determinación de la potencia microbiológica de antibióticos, debido a que tiene un gran rango (60 a 150%), por lo que difícilmente una muestra a analizar pueda salirse de estos límites.

El método consiste en la preparación de cinco concentraciones, dosis o niveles de la muestra de referencia y sólo un nivel de la muestra a determinar, ésta se prepara para tener una concentración igual a la que se tiene a la mitad de la curva. Se usan tres cajas para cada nivel y en cada una de ellas se llenan tres cilindros con el nivel respectivo y los otros tres con la solución cuya concentración está a la mitad de la curva a la cual llamaremos Dilución Óptima (DO). En otras palabras, para hacer la curva estándar se requieren doce cajas, en ellas habrá nueve zonas para la DO. Los cilindros se llenan en forma alterna. Para cada muestra será necesario aumentar tres cajas, las cuales se llenan de la misma forma, es decir, nueve zonas con la concentración o dilución óptima de la muestra y nueve zonas para la DO de la muestra de referencia.

Para determinar la potencia de la muestra ensayada, se suma o se resta al promedio de las zonas de la muestra (Mmt) la diferencia que haya entre el promedio de las zonas de la

DO (36 en total) que llamaremos St y el promedio de las zonas de la DO que se corrió en las mismas cajas de la muestra (9 en total) que llamaremos Smt, por consiguiente se tiene:

$$Mt = Mmt + (St - Smt)$$

donde Mt es el promedio corregido de las zonas de la muestra y este valor es el que se interpola en la curva estándar.

Esta corrección se hace también en los promedios de las zonas de los niveles que se usaron para hacer la curva. Una vez ajustada la muestra y los demás puntos, el resultado se lee a partir de la curva estándar.

La curva estándar se construye al graficar los promedios corregidos de las zonas en papel semilogarítmico de 2 ciclos, en la escala logarítmica se grafican las concentraciones y en la escala aritmética los milímetros de las zonas de inhibición. La gráfica debe ser lineal y para ello se buscará la línea que logre mayor ajuste de acuerdo a los datos obtenidos. Esto evitará los errores inherentes en la medición de cada punto y da una interpretación matemática más simple. Una forma de hacer cumplir esto último es por el método de mínimos cuadrados, el cual no es difícil de calcular. La linealidad de la gráfica por los puntos obtenidos le da una idea al analista sobre si se efectuó un buen ensayo y le asegura que no hay un punto que le pueda influir en la pendiente de la línea.

Las ecuaciones para calcular la gráfica por el método de mínimos cuadrados son las siguientes:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

donde L es el diámetro calculado para la concentración más baja, H es el diámetro calculado para la concentración más alta, c es el diámetro promedio a partir de las 36 lecturas de la DO (0.100 mcg/ml) y a, b, d y e son los diámetros corregidos para las concentraciones de 0.064, 0.080, 0.125 y 0.156 mcg/ml de la muestra de referencia, respectivamente (5) (7) (19).

2.4.2. Diseño 2 + 2. Ensayo factorial de dos niveles.

El diseño 2 + 2 también llamado simétrico o balanceado, fué descrito por Knudsen y Randall en 1945 como un diseño sencillo y eficaz para el ensayo de penicilina (13).

Para efectuar este ensayo se preparan dos concentraciones diferentes (0.080 y 0.156 mcg/ml) para cada una de las muestras a determinar así como también para la muestra de referencia, el número de replicaciones puede ser variable teniendo en mente que a mayor número, mayor es la confiabilidad (en este estudio el número fué de seis). El diseño utilizado para llenar los cilindros es el siguiente:

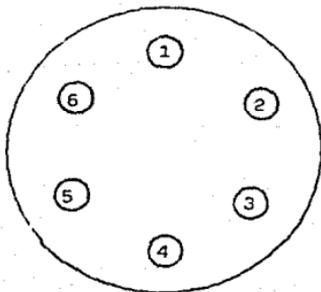


Fig. 5.

		<u>Conc. Alta</u>	<u>Conc. Baja</u>
Referencia	(S)	1	4
Muestra No 1	(T ¹)	2	5
Muestra No 2	(T ²)	3	6

A partir de este diseño existen varias modificaciones para la comparación simultánea de una, dos o más muestras y una de esas modificaciones es el uso de placas grandes con el diseño de cuadrados latinos y el de cuadrados casi-latinos.

El procedimiento para calcular la potencia se puede representar gráficamente por la línea de respuesta de las dos concentraciones o dosis entre la muestra y la de referencia. La potencia se calcula por la diferencia que existe entre la distancia vertical de las dos líneas paralelas (ver figura No 6).

Las líneas son paralelas pero estas líneas de respuesta están sujetas a errores casuales, por ello, para un mejor cálculo:

$$E = 1/2 \left[(S_2 + T_2) - (S_1 + T_1) \right]$$

donde S_1 es la respuesta de la referencia a la dosis baja, S_2 es la respuesta de la referencia a la dosis alta, T_1 es la respuesta de la muestra a la dosis baja y T_2 es la respuesta de la muestra a la dosis alta.

En forma similar, para calcular la respuesta debido a la diferencia entre la muestra y la referencia, ésta se obtiene por la diferencia de las dos dosis y se llama F.

$$F = 1/2 \left[(T_1 + T_2) - (S_1 + S_2) \right]$$

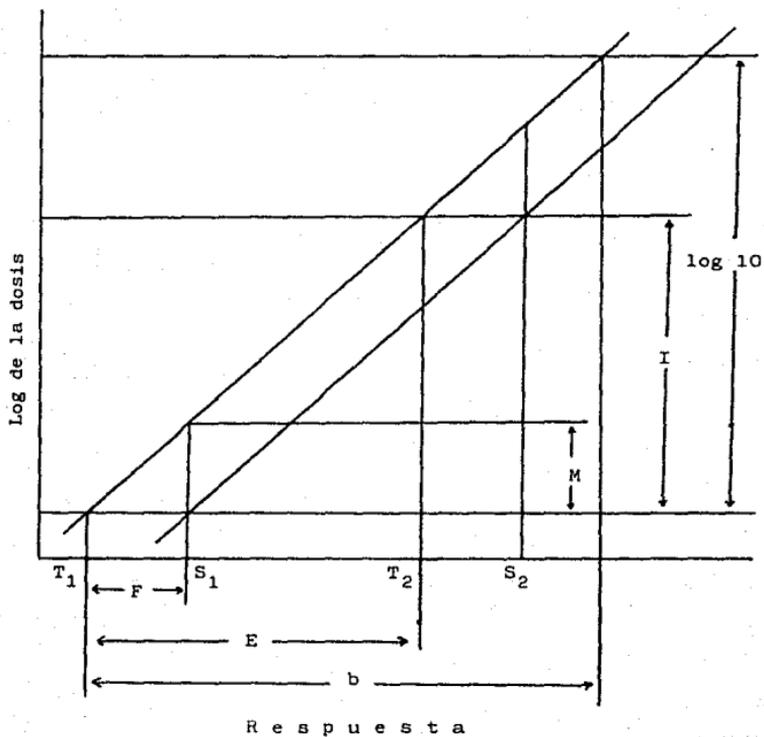


Fig. 6. Ilustración gráfica de las relaciones entre los símbolos usados en el cálculo de la potencia (13).

A partir de la gráfica se ve que la diferencia en el logaritmo de la dosis correspondiente a E es I, el logaritmo de la relación de la dosis y aquella correspondiente a F es M, el logaritmo de la relación de la potencia de la muestra a la potencia de la muestra de referencia. La gráfica también muestra el símbolo b, el cual es la diferencia calculada en la respuesta (suponiendo una línea recta) que corresponde a una relación de dosis 10:1. De una consideración similar de triángulos se ve fácilmente que:

$$F/M = E/I = b/\log 10 = b$$

por lo tanto:

$$M = F/b$$

La potencia se obtiene tomando el antilogaritmo de M.

En el presente estudio E y F se modifican debido a que el diseño 2 + 2 se realizó con dos muestras.

$$E = 1/2 \left[(S_2 + T_2^1 + T_2^2) - (S_1 + T_1^1 + T_1^2) \right]$$

$$\text{para } T^1 \quad F = 1/2 \left[(T_2^1 + T_1^1) - (S_2 + S_1) \right]$$

$$\text{para } T^2 \quad F = 1/2 \left[(T_2^2 + T_1^2) - (S_2 + S_1) \right]$$

donde T_1^1 es muestra No 1 dosis baja, T_2^1 es muestra No 1 dosis alta, T_1^2 es muestra No 2 dosis baja, T_2^2 es muestra No 2 dosis alta, S_1 es referencia dosis baja y S_2 es referencia dosis alta.

2.4.3. Diseño cuadrados latinos 6 x 6.

Cuando se lee el tamaño de las zonas en una caja Petri el operador conoce a qué dosis y a qué muestra corresponde la zona que está leyendo, no así cuando se hacen las lecturas en una placa grande, ya que las soluciones se han puesto al azar y se desconoce la solución a que corresponde la zona que lee. Para evitar el aprendizaje de las zonas, se debe de disponer de varios diseños de colocar las soluciones, de esta forma, el operador realiza una estimación completamente objetiva del tamaño de la zona (1) (12) (13).

Se pueden realizar los siguientes esquemas:

1 6 4 2 5 3	3 5 1 4 6 2	2 6 3 1 5 4	4 5 2 3 1 6
6 5 2 3 1 4	4 2 5 3 1 6	4 1 5 3 2 6	2 3 6 1 4 5
5 4 3 6 2 1	1 6 4 2 5 3	3 5 2 4 6 1	3 6 1 2 5 4
4 2 5 1 3 6	2 4 6 1 3 5	1 4 6 2 3 5	1 2 5 4 6 3
2 3 1 4 6 5	6 1 3 5 2 4	5 2 4 6 1 3	5 4 3 6 2 1
3 1 6 5 4 2	5 3 2 6 4 1	6 3 1 5 4 2	6 1 4 5 3 2
(a)	(b)	(c)	(d)

Como se observa, en los esquemas aparece únicamente un número por columna y por fila (9).

El llenado de la placa se realiza empezando por la primera fila y avanzando de izquierda a derecha, una vez termina se sigue por la segunda fila y nuevamente avanzando de izquierda a derecha y así sucesivamente. De esta forma, se observa que las zonas de las columnas de la izquierda son mayores que las de la derecha a causa del tiempo de predifusión.

III ANALISIS ESTADISTICO

El presente estudio trata de determinar si los diseños 5×1 , 2×2 y 6×6 ofrecen la misma precisión o si existen diferencias significativas, entendiéndose por equivalentes a que puedan ser usados indistintamente para la determinación de la potencia de un antibiótico. La mejor forma de resolver este problema, es por medio de un análisis estadístico.

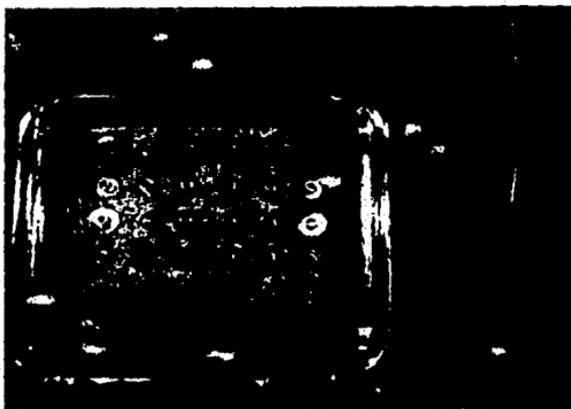
La ciencia estadística puede considerarse como los procedimientos, métodos o pruebas que tienen como objetivo el analizar datos, esto es, organizar y dar significado a la información. Un método estadístico representa una probabilidad alta de que una determinada hipótesis sea verdadera o falsa. La hipótesis es una suposición sobre la población que se está ensayando.

El análisis de varianza es uno de los métodos estadísticos más utilizados y elaborados en la investigación moderna. El análisis de varianza, no obstante su denominación, se utiliza para probar hipótesis referentes a las medias de población más que a las variancias de población. Al realizar esta técnica a partir de la información obtenida de un experimento se trata de aislar y estimar las variancias separadas que contribuyen a la total varianza de un experimento.

El procedimiento para el análisis de varianza es el siguiente (3) (6) (8) (11):

- 1) Formulación de la hipótesis. No existe diferencia significativa entre los diseños y las muestras. Esta hipótesis se designa como H_0 .
- 2) Formulación de la hipótesis contraria (H_1).
- 3) Selección de la prueba estadística. Prueba F.
- 4) Nivel de significación de la prueba. $\alpha = 0.05$.
- 5) Calcular el dato requerido. Valor de F experimental (F_{exp}).

6) Aplicar la prueba de significación. Aceptar o rechazar a H_0 .



Fotografía No 1. Fotografía tomada del diseño 6 x 6, donde se observa la influencia posicional entre las zonas interiores y las que bordean la placa, causando con ello las diferencias en el tamaño de los halos de inhibición.



Fotografía No 2. Fotografía tomada del diseño 2 + 2, en la cual se observa los diferentes tamaños de las zonas, esto es, un halo de inhibición mayor causado por la dosis alta y un halo de inhibición menor debido a la dosis baja.

TABLA I

Resultados de las muestras 1 y 2.
Potencia estimada: 100 %.

D I S E Ñ O

<u>5 + 1</u>		<u>2 + 2</u>		<u>6 x 6</u>	
M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂
95	95.5	105.5	101.5	100.8	97.4
96	95	98.6	97.0	97.3	96.8
96	98	102.5	102.6	102.7	104.7
97.5	98	103.3	101.5	100.3	104.4
102	98.5	97.7	97.4	96.2	96.5
99	98	101.1	102.3	99.0	101.0
98.5	101.5	99.8	103.0	100.0	100.3
96.5	100	95.4	97.0	96.6	100.1
102	98.5	100.6	97.2	100.2	101.3
101	100	101.7	99.5	102.7	105.2
103	103.5	101.8	101.1	100.7	104.6
105	103	106.0	100.2	104.0	101.4
103	99.5	102.7	102.3	101.4	97.5
102	102	97.3	100.4	99.1	99.4
104.5	97.5	104.0	103.0	105.1	96.7
95.5	95.5	99.7	99.6	101.6	102.5
103.5	101.5	99.8	99.0	101.8	102.3
99	102	97.8	99.3	96.1	95.2
96.5	95	99.4	96.1	103.7	101.3
98.5	102	97.8	94.2	99.4	96.6

TABLA II

Resultados de las muestras 1 y 2.
Potencia estimada: 90 %.

D I S E Ñ O

<u>5 + 1</u>		<u>2 + 2</u>		<u>6 x 6</u>	
M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	N ₁	M ₂
86.5	89	88.2	90.0	89.4	85.2
86.5	87	91.0	90.2	92.0	87.4
87.5	86	92.1	88.5	91.2	87.2
91	89.5	91.0	89.4	89.0	85.2
89	90	89.8	90.8	90.8	87.1

TABLA III

Resultados de las muestras 1 y 2.
Potencia estimada: 110 %.

DISEÑO

<u>5 + 1</u>		<u>2 + 2</u>		<u>6 x 6</u>	
M_1	M_2	M_1	M_2	M_1	M_2
113	115	112.4	106.6	111.5	112.6
113.5	108.5	106.7	109.3	109.3	115.4
108.5	107.5	103.4	110.5	110.6	111.4
106	103.5	109.2	107.2	105.0	105.2
110	108.5	109.6	108.0	109.0	111.7

TABLA IV

ANALISIS DE VARIANZA

Potencia estimada: 100 %.

Nivel de significancia: α .05

DISEÑO	<u>5 + 1</u>	<u>2 + 2</u>	<u>6 x 6</u>	
		MUESTRA 1		
	95	105.5	100.8	
	96	98.6	97.3	
	96	102.5	102.7	
	.	.	.	
	.	.	.	
	.	.	.	
	98.5	97.8	99.4	
TOTAL	1994	2012.5	2008.7	6015.2
		MUESTRA 2		
	95.5	101.5	97.4	
	95	97.0	96.8	
	98	102.6	104.7	
	.	.	.	
	.	.	.	
	.	.	.	
	102	94.2	96.6	
TOTAL	1984.5	1994.2	2005.2	5983.9
Σ	3978.5	4006.7	4013.9	11999.1

$$\begin{aligned}
 SC_t &= \sum X_t^2 - \frac{(\sum X_t)^2}{N_t} \\
 &= 95^2 + 96^2 + 96^2 + \dots + 96.6^2 - \frac{(11999.1)^2}{120} \\
 &= 1200778.09 - 1199820.006 \\
 &= 958.084
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_{intra} &= \sum X_k^2 - \frac{(\sum X_k)^2}{N} \\
 &= 1200778.09 - \frac{1994^2 + 2012.5^2 + \dots + 2005.2^2}{20} \\
 &= 1200778.09 - 1199848.443 \\
 &= 929.647
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_c &= \frac{\sum (\sum X_c)^2}{N_c} - \frac{(\sum X_t)^2}{N_t} \\
 &= \frac{3978.5^2 + 4006.7^2 + 4013.9^2}{40} - \frac{11999.1^2}{120} \\
 &= 1199837.508 - 1199820.006 \\
 &= 17.502
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_r &= \frac{\sum (\sum X_r)^2}{N_r} - \frac{(\sum X_t)^2}{N_t} \\
 &= \frac{6015.2^2 + 5983.9^2}{60} - \frac{11999.1^2}{120} \\
 &= 1199828.17 - 1199820.006 \\
 &= 8.164
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_{cr} &= SC_t - SC_{intra} - SC_c - SC_r \\
 &= 958.084 - 929.647 - 17.502 - 8.164 \\
 &= 2.771
 \end{aligned}$$

Cálculo de los grados de libertad (gl)

$$gl_t = N_t - 1 = 120 - 1 = 119$$

$$gl_{intra} = K (N - 1) = 6 (20 - 1) = 114$$

$$gl_c = c - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$gl_r = r - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$gl_{cr} = (c - 1) (r - 1) = (3 - 1) (2 - 1) = 2$$

Tabla del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F _{exp}
Inter				
Columnas	17.502	2	8.751	1.07
Renglones	8.164	1	8.164	1.00
Interacción	2.771	2	1.386	0.17
Intra	929.647	114	8.155	

Conclusión:

Columnas: $1.07 < F_{.95} = 3.08$, se concluye que las medias de los tres diseños son iguales.

Renglones: $1.00 < F_{.95} = 3.93$, se concluye que las medias de las muestras 1 y 2 son iguales.

Interacción: $0.17 < F_{.95} = 3.08$, se concluye que los efectos de interacción no están presentes.

TABLA V

ANALISIS DE VARIANZA

Potencia estimada: 90 %.

Nivel de significancia: α .05

DISEÑO	<u>5 + 1</u>	<u>2 + 2</u>	<u>6 x 6</u>	
	MUESTRA 1			
	86.5	88.2	89.4	
	86.5	91.0	92.0	
	87.5	92.1	91.2	
	91	91.0	89.0	
	89	89.8	90.8	
TOTAL	440.5	452.1	452.4	1345.0
	MUESTRA 2			
	89	90.0	85.2	
	87	90.2	87.4	
	86	88.5	87.2	
	89.5	89.4	85.2	
	90	90.8	87.1	
TOTAL	441.5	448.9	432.1	1322.5
Σ	882	901.0	884.5	2667.5

$$\begin{aligned}
 SC_t &= \sum X_t^2 - \frac{(\sum X_t)^2}{N_t} \\
 &= 86.5^2 + 86.5^2 + \dots + 87.1^2 - \frac{(2667.5)^2}{30} \\
 &= 237298.51 - 237185.2083 \\
 &= 113.3017
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_{intra} &= \sum X_t^2 - \frac{\sum (\sum X_k)^2}{N} \\
 &= 237298.51 - \frac{440.5^2 + 452.1^2 + \dots + 432.1^2}{5} \\
 &= 237298.51 - 237248.858 \\
 &= 49.652
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_c &= \frac{\sum (\sum X_c)^2}{N_c} - \frac{(\sum X_t)^2}{N_t} \\
 &= \frac{882^2 + 901^2 + 884.5^2}{10} - \frac{2667.5^2}{30} \\
 &= 237206.525 - 237185.2083 \\
 &= 21.3167
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_r &= \frac{\sum (\sum X_r)^2}{N_r} - \frac{(\sum X_t)^2}{N_t} \\
 &= \frac{1345^2 + 1322.5^2}{15} - \frac{2667.5^2}{30} \\
 &= 237202.0833 - 237185.2083 \\
 &= 16.875
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_{cr} &= SC_t - SC_{intra} - SC_c - SC_r \\
 &= 113.3017 - 49.652 - 21.3167 - 16.875 \\
 &= 25.458
 \end{aligned}$$

Cálculo de los grados de libertad (gl)

$$gl_t = N_t - 1 = 30 - 1 = 29$$

$$gl_{intra} = K (N - 1) = 6 (5 - 1) = 24$$

$$gl_c = c - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$gl_r = r - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$gl_{cr} = (c - 1) (r - 1) = (3 - 1) (2 - 1) = 2$$

Tabla del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F _{exp}
Inter				
Columnas	21.316	2	10.658	2.58
Renglones	16.875	1	16.875	4.08
Interacción	25.458	2	12.729	3.08
Intra	49.652	24	4.138	

Conclusión:

Columnas: $2.58 < F_{.95} = 3.40$, se concluye que las medias de los tres diseños son iguales

Renglones: $4.08 < F_{.95} = 4.26$, se concluye que las medias de las muestras 1 y 2 son iguales.

Interacción: $3.08 < F_{.95} = 3.40$, se concluye que los efectos de interacción no están presentes.

TABLA VI

ANALISIS DE VARIANZA

Potencia estimada: 110 %.

Nivel de significancia: α .05

DISEÑO	<u>5 + 1</u>	<u>2 + 2</u>	<u>6 x 6</u>	
	MUESTRA 1			
	113	112.4	111.5	
	113.5	106.7	109.3	
	108.5	108.4	110.6	
	106	109.2	105.0	
	110	109.6	109.0	
TOTAL	551	546.3	545.4	1642.7
	MUESTRA 2			
	115	106.6	112.6	
	108.5	109.3	115.4	
	107.5	110.5	111.4	
	103.5	107.2	105.2	
	108.5	108.0	111.7	
TOTAL	543	541.6	556.3	1640.9
Σ	1094	1087.9	1101.7	3283.6

$$\begin{aligned}
 SC_t &= 113^2 + 113.5^2 + \dots + 111.7^2 - \frac{(3283.6)^2}{30} \\
 &= 359646.56 - 359400.9653 \\
 &= 245.5947
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_{intra} &= 359646.56 - \frac{551^2 + 546.3^2 + \dots + 556.3^2}{5} \\
 &= 359646.56 - 359431.02 \\
 &= 215.54
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SC_c &= \frac{1094^2 + 1087.9^2 + 1101.7^2}{10} - \frac{3283.6^2}{30} \\
 &= 359410.53 - 359400.9653 \\
 &= 9.5647
 \end{aligned}$$

$$SC_r = \frac{1642.7^2 + 1640.9^2}{15} - \frac{3283.6^2}{30}$$

$$\begin{aligned}
 SC_{cr} &= 245.5947 - 215.54 - 9.5647 - 0.108 \\
 &= 20.382
 \end{aligned}$$

Cálculo de los grados de libertad (gl)

$$gl_t = 29$$

$$gl_{intra} = 24$$

$$gl_c = 2$$

$$gl_{cr} = 2$$

$$gl_r = 1$$

Tabla del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F _{exp}
Inter				
Columnas	9.565	2	4.782	0.53
Renglones	0.108	1	0.108	0.01
Interacción	20.382	2	10.191	1.13
Intra	215.54	24	8.981	

Conclusión:

Columnas: $0.53 < F_{.95} = 3.40$, se concluye que las medias de los tres diseños son iguales.

Renglones: $0.01 < F_{.95} = 4.26$, se concluye que las medias de las muestras 1 y 2 son iguales.

Interacción: $1.13 < F_{.95} = 3.40$, se concluye que los efectos de interacción no están presentes.

IV DISCUSION

El estudio estadístico concluye que los resultados obtenidos utilizando los tres diseños y las dos muestras no tienen diferencias significativas, lo que permite determinar la equivalencia de los tres métodos.

La elección de alguno de ellos, se deberá determinar de acuerdo con la experiencia del personal responsable de este trabajo, así como un análisis que determine ventajas o desventajas para cada uno de los métodos.

El presente trabajo tiene como limitante el haberse ensayado únicamente con ampicilina, sin embargo, otros antibióticos que sean estimados con el método tradicional 5 + 1 pueden ser analizados con los otros dos diseños.

A continuación se dará una breve discusión de los aspectos más importantes de los diseños ensayados.

DISEÑO 5 + 1. El diseño 5 + 1 es el de elección cuando se desconoce la potencia estimativa de una muestra, ya que como se dijo anteriormente el rango que cubre este diseño es bastante amplio (60 a 150 %).

Su principal desventaja es la utilización de un mayor número de cajas y esto se vuelve crítico cuando existen varias muestras por analizar.

El costo que tiene este diseño es mucho mayor al de un diseño factorial, esto es, para analizar una muestra es necesario utilizar 15 cajas y por cada muestra adicional será necesario usar otras tres cajas y así sucesivamente. No así en el diseño factorial, el cual tiene versatilidad para la estimación de antibióticos que pueden ser acoplados a las necesidades de trabajo.

El tiempo que se invierte al realizar este diseño es ma

yor también, por lo que se requerirá mayor experiencia del personal que realiza este trabajo.

Es en este método donde se presenta con mayor claridad el fenómeno de la predifusión, debido a que los primeros cilindros que se llenan presentan zonas de inhibición mayores al de las zonas de los cilindros que se llenan al último.

La Farmacopea Mexicana (7) considera dos aspectos importantes para el cumplimiento de este diseño:

- 1) El uso de una sola dosis de la muestra, debe apoyarse en estudios que demuestren el paralelismo de las curvas logarítmico de la dosis-respuesta.
- 2) El análisis de la varianza permite detectar desviaciones del efecto lineal del logaritmo de la dosis sobre la respuesta.

Si estas dos condiciones no se cumplen, la validez del estimado de la potencia de la muestra es dudosa, debido a que son supuestos del modelo de líneas paralelas.

DISEÑO 2 + 2. Este diseño compara la línea de respuesta de la muestra con la de referencia, permitiendo una versatilidad de ensayos que de acuerdo al número de concentraciones o niveles de dosis que se preparen y al número de muestras a analizar se clasifican en diseños balanceados y no balanceados.

Los primeros son aquéllos en donde el número de niveles de muestra y de referencia son iguales. Los diseños no balanceados son aquéllos donde el número de niveles de dosis de la muestra de referencia es mayor al de la muestra a analizar.

Aunque la caja Petri tiene como limitante 6 lugares, aún así, existe una serie de modelos que se pueden ajustar a las diferentes necesidades de trabajo (ver anexo I).

Para verificar si un ensayo cumple con este modelo, debe satisfacer los siguientes requisitos (7):

- 1) Que la relación entre el logaritmo de la dosis y la respuesta puede ser representada por una línea recta, en el intervalo de dosis ensayada.
- 2) Para cualquier muestra en el ensayo, la línea recta debe ser paralela a la de referencia.

El cumplimiento de ambos requisitos se verifica al hacer el análisis de datos. El primer requisito sólo puede verificarse en ensayos en que se hayan ensayado al menos tres diluciones (dosis) de cada preparación. La elección de un ensayo con solo dos diluciones de cada preparación, debe apoyarse en estudios previos, que demuestren linealidad de la relación logaritmo dosis-respuesta.

Finalmente, se puede decir que si se conoce la potencia estimada de la muestra, este diseño ofrece un resultado confiable por el mismo o tal vez menos esfuerzo práctico, debido fundamentalmente a que compara la línea de respuesta de la muestra con la de referencia.

DISEÑO 6 x 6. El ensayo en placas grandes lleva a una gran variedad de recursos para la determinación de antibióticos. En este tipo de placas pueden ensayarse diferentes muestras al mismo tiempo con una o más dosis, todo ello dependerá, por supuesto, de la cantidad y calidad de trabajo que uno desca.

El uso de placas grandes disminuye las variaciones que se puedan tener con el uso de cajas Petri, estas variaciones pueden ser dos principalmente: mayor uniformidad de temperatura y mayor regularidad en el tiempo de predifusión. Para explicar más ampliamente lo anterior diremos que en la placa grande tenemos sólo una capa inoculada y de ahí que la tempe-

ratura sea más uniforme, no así en las cajas Petri, donde se tienen que hacer columnas de 3 o 4 (no es recomendable poner más de cuatro), teniendo en cuenta la cantidad de trabajo y el tamaño de la estufa de incubación. Por otra parte, el tiempo de predifusión en las cajas tiene mayor variación, debido a que existe una diferencia de tiempo entre la adición de la primera y la última. En el caso de las placas grandes esto se reduce a que se va llenando uno por uno cada cilindro y la forma en que se disponen es tal que, el tiempo que se tarda en llenar una serie es la misma para todos.

Existe una influencia posicional en el tamaño de las zonas en las placas grandes. Esta diferencia está entre las zonas interiores y las zonas que bordean la placa. Las zonas interiores están rodeadas de depósitos los cuales mantienen la humedad del medio no así en los bordes donde el agar tiende a secarse debido a que su contenido de humedad es bajo, motivando con ello a que la difusión se haga más rápido y las zonas tienden a ser más grandes. Este efecto se ve reducido por la azarización del diseño.

Cabe hacer mención que la tapa que se usó en este diseño es de vidrio, al cual se le adhiere papel filtro y se le humedece ligeramente. Esto tiene por objeto de que el agua de condensación no caiga al medio, además de mantener el ambiente húmedo. En las cajas Petri no existe este problema puesto que se usan tapas de porcelana porosa.

V CONCLUSIONES

- 1) De acuerdo con el análisis de varianza el método tradicional es equivalente a los otros dos diseños, por lo tanto, los tres métodos son equivalentes debido a que la F calculada es menor a la F de tablas con un nivel de significación de .05.
- 2) El método que se recomienda en base a este trabajo es el del ensayo en líneas paralelas 2 + 2.
- 3) Este estudio se realizó con ampicilina, pero es de suponerse que otros antibióticos a los que se determine la potencia por difusión de agar con el método 5 + 1, pueden estimarse por cualquiera de los otros dos diseños.
- 4) El número de ensayos no se calculó en forma estadística, es decir, que en un experimento, se deberá conocer primamente el número de ensayos a realizar, con objeto de no hacer un gasto innecesario de recursos ni tampoco tener un número bajo de los mismos que ocasionen resultados poco prácticos.
- 5) Del presente trabajo se puede inducir que para que los métodos turbidimétricos sean estimados a través de los ensayos en paralelo, se debe establecer en la práctica el número de replicaciones.
- 6) El comparar los tres métodos con dos muestras de diferente proveedor, da mayor seguridad en los resultados.

ANEXO I

CALCULOS PARA ENSAYOS DE LINEAS PARALELAS (13)

Cálculo de E y F en diseños balanceados

Número de dosis	Número de muestras	E	F	Notas
2	1	$\frac{1}{2} (S_2+T_2)-(S_1+T_1) $	$\frac{1}{2} (T_2+T_1)-(S_2+S_1) $	a, c
	2	$\frac{1}{3} (S_2+T_2^1+T_2^2)-(S_1+T_1^1+T_1^2) $	$\frac{1}{2} (T_2^1+T_1^1)-(S_2+S_1) $	a, b
3	1	$\frac{1}{4} (S_3+T_3)-(S_1+T_1) $	$\frac{1}{3} (T_3+T_2+T_1)-(S_3+S_2+S_1) $	a, b

Cálculo de E y F en diseños no balanceados

Número de dosis del estándar	Número de dosis de la muestra	Número de muestras	E	F	Notas
2	1	1	S_2-S_1	T^1-S_2	a
3	2	1	$\frac{1}{5} (2S_3+T_2)-(2S_1+T_1) $	$\frac{1}{2} (T_1-T_2)-\frac{1}{3} (S_1+S_2+S_3)$	a

NOTAS: a- Caja Petri

b- Cuadrados latinos 6 x 6

c- Cuadrados latinos 4 x 4

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Baille, A., Gilbert, R. J.
AUTOMATION MECHANIZATION AND DATA HANDLING IN
MICROBIOLOGY
2ª Edición
Academic Press
New York
(1973)
- 2.- Barry, A. L.
THE ANTIMICROBIC SUSCEPTIBILITY TEST
Lea & Febiger
Great Britain
(1976)
- 3.- Bauer, E. L.
MANUAL DE ESTADISTICA PARA QUIMICOS
1ª Edición
Editorial alhambra, S. A.
España
(1974)
- 4.- Brock, T. D.
BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS
Ediciones Omega, S. A.
Barcelona
(1976)
- 5.- CODE OF FEDERAL REGULATIONS FOOD AND DRUGS
U. S. Government Printing Office Washington
(1981)
- 6.- Daniel, W. W.
BIOESTADISTICA, BASE PARA EL ANALISIS DE LAS CIENCIAS
DE LA SALUD
1ª Edición
Editorial Limusa, S. A. de C. V.

- México
(1987)
- 7.- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
5ª Edición
México
(1988)
- 8.- Finney, D. J.
STATISTICAL METHOD IN BIOLOGICAL ASSAY
London
(1963)
- 9.- Fisher, R. A., Yates, F.
STATISTICAL TABLES FOR USE IN BIOLOGICAL, AGRICULTURAL
AND MEDICAL RESEARCH
6ª Edición
Longman
London
(1963)
- 10.- Florey, H. W. et. al.
ANTIBIOTICS vol. I
Oxford University Press, Amen House
London
(1949)
- 11.- EUROPEAN PHARMACOPOEIA vol. II
Maisonneuve, S. A.
France
(1971)
- 12.- Hammond, S. M., Lambert, P. A.
ANTIBIOTICS AND ANTIMICROBIAL ACTION
The Camelot Press Ltd.
Southampton, Great Britain
(1978)

- 13.- Hewitt, W.
MICROBIOLOGICAL ASSAY
Academic Press
New York
(1977)
- 14.- Kavanagh, F.
ANALYTICAL MICROBIOLOGY vol. I
Academic Press
New York
(1963)
- 15.- Kavanagh, F.
ANALYTICAL MICROBIOLOGY vol. II
Academic Press
New York
(1972)
- 16.- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S.
ELEMENTOS DE MICROBIOLOGIA
McGraw Hill
México
(1984)
- 17.- PHARMACOPOEA HELVETICA
6ª Edición
Edición Francesa
Suiza
(1971)
- 18.- REMINGTON FARMACIA
17ª Edición
Editorial Médica Panamericana
Argentina
(1987)
- 19.- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA
21th Revision

Mack Printing Company
Easton, Pa. USA
(1985)