



29  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CORRELACION ENTRE CONCENTRACION  
MINIMA INHIBITORIA Y SENSIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE Salmonella ssp

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

P R E S E N T A:

Alma Leyla Canell Aquino:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1990



## **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.

## I N D I C E

|      |                                       |    |
|------|---------------------------------------|----|
| I    | INTRODUCCION                          | 1  |
| II   | GENERALIDADES                         | 3  |
|      | 1. ANTIBIOTICOS                       |    |
|      | A. MECANISMOS DE ACCION               |    |
|      | B. MECANISMOS DE RESISTENCIA          |    |
|      | 2. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS |    |
|      | A. METODO DE DISCO                    |    |
|      | B. METODO DE DILUCION                 |    |
| III  | MATERIAL Y METODOS                    | 33 |
| IV   | RESULTADOS                            | 43 |
| V    | DISCUSION                             | 63 |
| VI   | CONCLUSIONES                          | 67 |
| VII  | RESUMEN                               | 68 |
| VIII | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS            | 69 |
| IX   | APENDICE                              | 72 |

## INTRODUCCION

Algunas especies del género Salmonella durante mucho tiempo se han considerado como agentes etiológicos de infecciones sistémicas, gastroenteritis y envenenamientos alimentarios, estos dos últimos padecimientos generalmente no ameritan tratamiento con antimicrobianos; sin embargo, si se emplean en número limitado, en el tratamiento de gastroenteritis severas e infecciones sistémicas (1).

Con objeto de administrar el fármaco más adecuado para estos microorganismos, se ha empleado para determinar cual sería el mejor, la prueba de sensibilidad "in vitro" frente a diferentes antibióticos; esta prueba ampliamente conocida es el método de difusión, empleando discos de determinada concentración y teniendo cuidado de seguir todos los lineamientos establecidos por Kirby-Bauer (2). También se utilizan otros métodos "in vitro" como el de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) considerado como el más preciso para conocer la acción bactericida o bacteriostática de los fármacos, pero como este método es el más laborioso y de mayor costo, no se emplea frecuentemente (3). El siguiente trabajo se llevó a cabo con el propósito de determinar si existe correlación entre los resultados obtenidos por los dos métodos, utilizando como microorganismos a probar cepas aisladas de hemocultivos, secreciones y materia fecal, de niños que asisten a la consulta externa o permanecen hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría y que se enviaron al laboratorio de Bacteriología.

Los métodos empleados, como ya se mencionó, fueron el de Kirby-Bauer (método de disco) y el de la CMI, los antibióticos fueron ampicilina, amikacina, cloranfenicol y gentamicina.

### GENERALIDADES

Con el objetivo de atacar las infecciones bacterianas en el hombre, se han utilizado los antimicrobianos, sustancias o fármacos derivados del metabolismo secundario de un microorganismo u obtenidos de una síntesis química y que inhiben el crecimiento de los microorganismos ocasionándoles a veces un daño irreversible (4).

La literatura demuestra que hay una continua investigación sobre los agentes antimicrobianos, ya que a medida que se emplean, su acción va disminuyendo debido a la selección de cepas que no son susceptibles a estos fármacos. Esta selección se debe algunas veces al uso indiscriminado de dichas sustancias, por el empleo continuo de ellas en las infecciones, dando origen a cepas resistentes (5). La resistencia de un microorganismo puede deberse a dos diferentes mecanismos; a la mutación o al intercambio genético. La primera es poco frecuente y se presenta al azar dando como resultado una modificación en la susceptibilidad al agente, sirviendo solamente como un agente selectivo que favorece la supervivencia de microorganismos resistentes sobre los no resistentes, una vez que se ha producido la modificación genética y ésta se ha expresado fenotípicamente. La segunda forma de resistencia se debe a genes presentes en el cromosoma bacteriano o en el ácido desoxirribonucleico (ADN) extracromosómico y que se conoce como plásmido o factor de resistencia. El carácter resistente puede transmitirse de una célula que lo posee a otra que no lo tiene, por

medio de transferencia de material genético por los fenómenos de transformación, conjugación o transducción ( 6 ).

La historia de la quimioterapia o sea el empleo de estas sustancias, se divide en tres periodos. En el primero, el cual es el más antiguo, las sustancias capaces de curar una infección por acción sistémica, fueron productos naturales de las plantas. El segundo fue la era de la síntesis y en el tercero retornan los productos naturales de las plantas, aunque son de un orden mucho menor o sea hongos y bacterias que producen antibióticos ( 4 ).

## 1. ALCALOIDES

En el año 1619 se realizó el primer tratamiento eficaz contra la malaria en la esposa del gobernador español del Perú, usando un extracto de la corteza de chinchona. También en América del Sur se empleó la raíz de la ipecacuana como tratamiento de la disentería amibiana. Hasta principios de este siglo se emplearon los extractos que actualmente se utilizan, de la quinina y la emetina así como derivados de ellos, que constituyen la única quimioterapia curativa contra la malaria y la disentería (4).

## 2. COMPUESTOS SINTETICOS

Estas sustancias se utilizaron inicialmente como agentes quimioterapéuticos en Alemania en 1909 por Ehrlich, quien descubrió el salvarsán, útil en el tratamiento de infecciones por protozoarios. Los compuestos derivados del arsénico solo eran útiles para los protozoarios y no para las bacterias, pero

al observar que los treponemas eran también susceptibles a estos compuestos, se creyó que esto se debía a que se trataba de una clase diferentes de bacterias. Con el descubrimiento del prontosil, se descartó la creencia de que las bacterias no eran susceptibles a sustancias no tóxicas para el hombre. El prontosil es el precursor de las sulfonamidas, empleadas desde el año de 1935. A partir de este año comienzan nuevas investigaciones que continúan hasta nuestros días, para la síntesis de nuevos agentes antimicrobianos ( 4 ).

### 3. ANTIBIOTICOS

En 1940 Florey demostró que la penicilina obtenida por Fleming en 1929, podía utilizarse para combatir un gran número de infecciones, constituyendo esto el principio de la era de los antibióticos ya que sustituyeron a las sulfonamidas en el tratamiento de las enfermedades causadas por estreptococo hemolítico, neumococo, Neisseria gonorrhoeae y N. meningitidis (4).

La penicilina, además de ser útil para las enfermedades cuyos agentes etiológicos no eran susceptibles al tratamiento de sulfonamidas, también era una forma de tratamiento para aquéllas susceptibles. Así pues, la penicilina pudo utilizarse cuando en los años de 1940 se observó resistencia a sulfonamidas en gonococos, estreptococos hemolíticos y neumococos; posteriormente, veinte años después, a meningococos (4).

Entre los agentes antimicrobianos más importantes tenemos los siguientes:

#### a. SULFONAMIDAS

Las investigaciones de los químicos Klarer y Mietzsch en 1932 condujeron a la obtención del prontosil o sulfonamido crisoidina y varios otros colorantes azoicos que contenían el grupo sulfonamida; pero se le reconoce a Domagk el descubrimiento, en 1935, del valor quimioterapéutico sobre enfermedades producidas por estreptococos hemolíticos, que le valió el premio Nobel de Medicina en 1938 (7).

El término sulfonamida se emplea como un nombre genérico de los derivados de la para-aminobenzenosulfonamida o sulfanilamina (6).

El prontosil "in vitro" es inactivo, pero en el organismo se degrada a p-aminobenzenosulfonamida, que es la mitad quimioterapéutica de la molécula (6).

El requerimiento estructural mínimo para la acción antibacteriana es que el azufre esté unido directamente al anillo de benceno y que el grupo amino se encuentre en posición para, de esta manera se retendrá como tal o será reemplazado por radicales que puedan ser convertidos en los tejidos a grupos aminos libres (6). Las sulfonamidas presentan actividad inhibitoria sobre un amplio espectro de

especies Gram positivas y Gram negativas, así como frente a Noocardia, Chlamydia y ciertos protozoarios como Plasmodium y Pneumocystis (6).

Son análogos estructurales del ácido p-aminobenzoico (PABA), precursor del ácido fólico, interfiriendo por ello en su síntesis, ya que inhiben la formación de 2-amino-4-hidroxi-6-dihidropteroico (6).

También compiten con el PABA para ocupar el sitio activo de la enzima, además de actuar como sustratos alternos para la dihidropteroato sintetasa (6).

Los microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar el ácido fólico son sensibles a las sulfonamidas, mientras que aquéllos que lo requieren preformado no son susceptibles (6)

La resistencia a las sulfonamidas se debe a lo siguiente:

- Algunas cepas sintetizan una enzima, sintetasa del ácido fólico, que tiene poca afinidad para las sulfonamidas.
- Cambios en el mecanismo de retroalimentación
- Una producción mayor del ácido p-aminobenzoico, el cual contrarresta el control de retroalimentación, haciendo que la bacteria no sea susceptible a las sulfonamidas o

sea que interfieren con la producción enzimática y su función (4).

#### b. TRIMETOPRIM SULFAMETOXAZOL

Es una combinación de dos quimioterápicos, uno perteneciente a la familia de las sulfonamidas (sulfametoxazol) y el otro a la 2,4-diaminopirimidinas (trimetoprim).

La acción bacteriana del trimetoprim es similar a la de las sulfonamidas, aunque es 100 veces más potente que las sulfonamidas contra bacterias Gram negativas. La capacidad de inhibir la multiplicación bacteriana se debe a que cada componente actúa en etapas diferentes de la síntesis del ácido tetrahidrofólico o sea que la sulfonamida inhibe la incorporación de PABA en el ácido fólico y el trimetoprim, por otro lado inhibe la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato. El mecanismo de resistencia bacteriana al trimetoprim sulfametoxazol se asocia también a la presencia de plásmidos que pueden ser transferidos a otros microorganismos susceptibles por conjugación (6,7).

#### c. PENICILINAS

La penicilina es un antibiótico muy importante. Fue descubierta accidentalmente por Fleming en 1929, cuando trabajaba con cepas de estafilococo, observando que un moho había contaminado unos de sus cultivos causando lisis a las

bacterias que lo rodeaban. Como este hongo era del género Penicillium, Fleming le dió el nombre de penicilina a la sustancia bacteriana producida por P. notatum; pero fue hasta 1939 cuando adquirió la categoría de medicamento de acción general en el organismo (7).

La molécula de penicilina se ha manipulado químicamente y se han producido compuestos naturales y semisintéticos (6).

El término penicilina es genérico para todo el grupo. Su estructura básica consiste en un anillo tiazolidínico, unido a un anillo beta-lactámico, unido a su vez a una cadena lateral que determina las propiedades antibacterianas y farmacológicas del compuesto (6).

Las penicilinas naturales son las producidas directamente por algunos hongos del género Penicillium como la penicilina G o bencilpenicilina que es la más importante, siendo efectiva contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (6). La penicilina G se inactiva por la enzima bacteriana penicilinasasa y el pH ácido del jugo gástrico, debido a esto se obtuvieron penicilinas semisintéticas, por medio de lo siguiente:

-Incorporar precursores específicos a los cultivos de hongos.

-Modificación de la síntesis del ácido 6-aminopenicilánico, donde lo único que los diferencia es la cadena lateral (7).

Las penicilinas semisintéticas se dividen en dos grupos:

- a. Las penicilinas resistentes a la penicilinasasa, grupo en el cual una modificación de la cadena lateral protege en contra de la enzima al anillo beta-lactámico, sin disminuir su actividad antibacteriana; algunas de ellas son la metecilina, nafcilina, que son ácido lábiles y las isoxazolilpenicilinas (cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina) que son ácido resistentes.
- b. El otro grupo es el de las penicilinas llamadas de amplio espectro debido a su capacidad para actuar sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos, donde una modificación de la cadena lateral aumenta la actividad contra las bacterias, éstas son la ampicilina y amoxicilina que son ácido estables y penicilinasasa sensibles (6).

El mecanismo de acción de las penicilinas consiste en inhibir la síntesis de algunos componentes de la pared celular bacteriana, actuando sobre una reacción de transpeptidación que va a complementar el enlace cruzado, perdiendo rigidez (6).

En general, los efectos nocivos de este grupo son las reacciones de hipersensibilidad en el hombre (6,7). La

resistencia bacteriana a la penicilina se debe, como se ha estado mencionando, a la presencia de una enzima, la penicilinasas, que rompe el anillo beta-lactámico y se llama también por ello beta-lactamasa. Es producida por bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y por el bacilo tuberculoso (7).

#### d. CEFALOSPORINAS

La primera fuente de las cefalosporinas fue el hongo Cephalosporium acremonium, lo aisló Brotzu en 1948 en una muestra de agua de mar cerca de un desagüe de aguas negras y fue estudiada y descrita por Florey en 1955 (6,7).

En el líquido de cultivo de este hongo se aislaron 3 antibióticos diferentes:

- Cefalosporina P, que es activa contra bacterias Gram positivas
- Cefalosporina N, un nuevo tipo de penicilina con una cadena lateral derivada del ácido D-alfa-aminodípico, eficaz contra bacterias Gram positivas y Gram negativas
- Cefalosporina C, menos potente que la anterior pero con el mismo espectro antibacteriano (7).

Todas las cefalosporinas poseen un anillo de dihidrotiazina de 6 miembros en lugar del anillo de tiozolidina de 5 miembros; las sustituciones en la posición 7 y en la cadena

lateral pueden alterar las propiedades antibacterianas y farmacológicas; sustituciones en diferentes posiciones del anillo afectan propiedades farmacológicas en mayor grado que la actividad microbiológica (6).

A este grupo pertenecen derivados semisintéticos del núcleo activo del producto natural, cefalosporina C y son la cefalotina, cefalexina, cefazolina, entre otros (7). El mecanismo de acción de las cefalosporinas y de sus derivados semisintéticos es también el de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, de manera similar a como lo realizan las penicilinas (4,6,7).

Las cefalosporinas son inhibidas por la acción de una enzima bacteriana llamada cefalosporinasa, producida por las bacterias Gram negativas; esta enzima probablemente es una beta-lactamasa, ya que también tiene esta acción. Algunos microorganismos producen una beta-lactamasa que actúa tanto sobre penicilina como cefalosporina y la actividad de cada una de estas enzimas varía según la cepa (7).

Los efectos secundarios son reacciones de hipersensibilidad al igual que las penicilinas y además, en general, son nefrotóxicas (4,7).

#### e. AMINOGLUCOSIDOS

En este grupo se han incluido varios antibióticos que tienen una estructura anular única de aminociclitol que forma el

armazón de cada uno de los miembros, es un derivado de inositol en el cual se han reemplazado varios grupos oxhidrilos o sustituido grupos amino. Algunos de los miembros representativos del grupo son la estreptomycin, gentamicina, kanamicina y amikacina (6).

#### - ESTREPTOMICINA

Fue descubierta en 1939 por Waksman, y es producida por Streptomyces griseus, pero no fue hasta 1944 que se demostró que inhibía el crecimiento de algunos microorganismos como el bacilo tuberculoso. Tiene una base orgánica de gran polaridad con numerosos grupos hidrofílicos y funcionales formada por 3 componentes que son la estreptidina, estreptosa y N-metil-L-glucosamina. Actúa sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas y particularmente contra Mycobacterium tuberculosis. La estreptomycin es más activa a pH alcalino que a pH ácido, por lo que se cree que disminuye su actividad si se da por vía oral (7).

Tiene efectos colaterales como el de ser ototóxico (7). Grandes poblaciones de especies cercanas de bacterias, incluyendo el bacilo tuberculoso, contienen unas cuantas células resistentes a 1,000 mcg/ml de estreptomycin, las cuales son rápidamente seleccionadas por el antibiótico. Es común el aumento en la resistencia a la estreptomycin después de unos cuantos pases en presencia del antibiótico

"in vitro" o después de unos cuantos días de haber comenzado el tratamiento (4).

Las cepas estreptomycinas resistentes, algunas veces tienden a reducir el valor de crecimiento y virulencia, pero muchos aparecen como virulentas como sus parientes sensibles (4).

La resistencia se debe principalmente a mutaciones seriadas que modifican desde una a 20 proteínas ribosomales (4).

#### - GENTAMICINA

Es un antibiótico de amplio espectro, obtenido del actinomiceto Micromonospora purpurea y fue estudiada por Weinstein en 1963 (7).

Está formada por 3 componentes estrechamente relacionados y son la gentamicina C1, C2 y C1A, que tienen aproximadamente igual actividad antimicrobiana "in vitro" (7). La gentamicina puede ser inactivada por una enzima que es la sintetasa de adenilato de gentamicina, que constituye el mecanismo de resistencia bacteriana (4).

Al igual que la estreptomycinas, es más activa en medios alcalinos (7). Es útil por su eficacia contra enfermedades severas por Pseudomonas aeruginosa.

Enterobacter y Klebsiella. Su efecto secundario principal es el de ser ototóxica (7).

#### - KANAMICINA

Fue aislada por Umezawa en el Instituto Nacional de Sanidad del Japón en 1957 y se obtiene de Streptomyces kanamyceticus (7).

Su estructura básica consta de dos aminoazúcares enlazados en forma glucosídica con la 2-desoxiestreptamina. Hay dos kanamicinas la A y B, que difieren en los grupos amino e hidroxilo de un aminoazúcar (7).

Actúa tanto contra bacterias Gram positivas como contra Gram negativas (7).

Su mecanismo de resistencia bacteriana suele deberse a un plásmido que produce enzimas que tienen la capacidad de fosforilar, acetilar o adenilar a la kanamicina (7).

#### - AMIKACINA

Fue el primer aminoglucósido semisintético introducido para el uso clínico (8).

Es un derivado de la kanamicina A obtenido por una acetilación continua con la L(-)-o-amino-o-hidroxi-butiril en un costado de la cadena donde está el C-1 del grupo amino de la mitad deoxiestreptamina (9).

Tiene acción contra muchas especies de enterobacterias y Pseudomonas aeruginosa y sobre bacilos Gram negativos resistentes a uno o más aminoglucósidos incluyendo la gentamicina y tobramicina (8).

No es destruída por varias enzimas bacterianas excepto por la 6-N-acetil-transferasa (6).

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos es el de actuar sobre la subunidad ribosómica 30 S, interrumpiendo drásticamente el ciclo ribosomal en la iniciación de la síntesis de proteínas. El nivel de los errores producidos por gentamicina y amikacina es mucho mayor que el producido por la estreptomycin (6,7).

#### f. TETRACICLINAS

Comprenden varios antibióticos estrechamente relacionados, que tienen actividad contra varios microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos y sobre micoplasmas, rickettsias y clamidias(6). El primer fármaco puesto en uso en 1948 fue la clorotetraciclina o aureomicina, en 1950 apareció en el mercado la terramicina producida respectivamente por Streptomyces aureofaciens y Streptomyces rimosus (7).

Al conocer la estructura química de estos dos compuestos se confirmó la similitud que había entre ellos proporcionando las bases de la síntesis de la tetraciclina en 1952 que es un

derivado semisintético de la clorotetraciclina. Se encuentran además varios derivados semisintéticos como son la doxiciclina, minociclina y metaciclina (7).

Las tetraciclinas son derivados de la naftacenocarboxamida policíclica, cada compuesto varía conforme a sus cambios en los radicales en diferentes posiciones de la molécula original (7).

Su mecanismo de acción se debe a la inhibición de la síntesis de proteínas en la subunidad ribosómica 30 S tanto de las células procarióticas como eucarióticas, siendo más eficientes como inhibidores de las primeras que de estas últimas (6).

Unos de los efectos colaterales más indeseables, asociados a la administración de tetraciclinas naturales, se debe a la incompleta absorción por vía oral, que produce eliminación de la flora intestinal y el posible desarrollo de una infección secundaria (7).

La resistencia bacteriana a las tetraciclinas se debe predominantemente a que presentan impermeabilidad al antibiótico, involucrándose como responsables a:

- Cambios en los receptores específicos para el antibiótico
- Pérdida de la capacidad para el transporte activo a través de la membrana celular

- Cambios estructurales en uno o varios componentes de la pared celular que afectan de una manera inespecífica (4).

#### g. CLORANFENICOL

Es un antibiótico producido por Streptomyces venezuelae, que fue aislado del suelo de Venezuela en 1947 por Burkholder (7).

Es activo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, rickettsias y clamidias (7).

El cloranfenicol se distingue de otros antibióticos naturales en que se deriva del ácido dicloroacético y contiene un nitrobenzenu. Es inactivado por enzimas bacterianas que reducen el grupo nitro y lo convierten en un grupo amino aromático primario, hidrolizando el enlace amídico (6).

Su mecanismo de acción consiste en inhibir el crecimiento de las bacterias, interfiriendo con la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosómica 50 S y, en consecuencia, inhibiendo las uniones peptídicas (6,7).

Sus efectos secundarios son las reacciones de hipersensibilidad así como también la aplasia de la médula ósea (7).

La resistencia bacteriana al cloranfenicol se debe a la acción de varias enzimas entre ellas la acetilasa, que la inactiva para actuar sobre la síntesis de proteínas. En

algunas ocasiones la resistencia puede deberse a una mutación espontánea (7).

#### h. ERITROMICINA

Fue descubierta en 1952 por Mcguire, en los productos metabólicos de Streptomyces erythreus (7).

Es un miembro de los antibióticos llamados macrólidos, caracterizados químicamente por poseer un anillo macrocíclico de lactona de 12 a 22 átomos de carbono unidos a 1 o más azúcares (6).

Su mecanismo de acción es semejante al del cloranfenicol, pero puede competir con la fijación de cloranfenicol a la subunidad ribosómica 50 S (6).

Se emplea como tratamiento en pacientes con enfermedades causadas por estreptococos del grupo A o por neumococo (7).

La resistencia bacteriana a la eritromicina es una propiedad genéticamente controlada por ribosomas y puede ser mutacional o mediada por plásmidos (6).

El efecto secundario es el de causar reacciones de hipersensibilidad (7).

## i. POLIMIXINAS

Fueron descubiertas en 1947 y constituyen un grupo de antibióticos similares (polimixinas A, B, C, D y E) elaboradas por diferentes cepas de Bacillus polymyxa (7).

En general, las polimixinas son decapeptidos que contienen un alto porcentaje de ácido 2,4-aminobutírico, un ácido graso y una mezcla de D- y L-aminoácidos. Las polimixinas empleadas son la B y E (7).

Actúan sobre bacterias Gram positivas, uniéndose específicamente a la superficie de la membrana celular, modificando su estructura y sus propiedades osmóticas, produciendo como consecuencia una pérdida de metabolitos e inhibiendo procesos bioquímicos (6). No es frecuente la aparición de resistencia bacteriana a la polimixina B en la mayoría de las especies (7).

Los efectos secundarios observados son la neurotoxicidad y la nefrotoxicidad (7).

## SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Una vez señalado el efecto de ciertas sustancias sobre los microorganismos, Fleming describe el primer método para determinar la susceptibilidad "in vitro". La técnica empleada fue la de "placa en surco", que consiste en quitar una tira de una caja con medio de agar, dejando un surco donde se coloca un extracto de hongos, las bacterias a probar se estirian perpendicularmente al surco, posteriormente se observa el crecimiento, interpretándolo como resistente si está presente hasta el surco y sensible en el caso de no observarlo cerca de éste (10).

A medida que han aparecido nuevos antibióticos, su uso ha sido indiscriminado ya que se ve que después de algún tiempo se eleva el número de cepas resistentes, de aquí que sea entonces necesario desarrollar otras pruebas que permitan conocer la susceptibilidad a varios antimicrobianos no sintetizados por hongos para tener un tratamiento eficaz (10).

A principios de la década de los 40 las pruebas de susceptibilidad se realizaron en caldo, y actualmente sirven como método de referencia, puesto que dejó de ser práctico, por la gran cantidad de material que se requiere; en 1943 Foster y Woodruff reportaron el uso de tiras de papel filtro impregnadas con diferentes antibióticos (10).

Vincent y Vincent en 1944 introdujeron el uso de discos de papel filtro impregnados con los antibióticos, aumentando así el número de los que se podían probar al mismo tiempo. En 1945 Morely agregó

otra variante al método, o sea discos de papel filtro secos conteniendo los antibióticos y evitando el uso de soluciones recientes (10).

Bondi y sus colaboradores establecieron la necesidad de emplear patrones para las diversas concentraciones, utilizando diferentes discos, siendo ésta la primera pauta para las aplicaciones clínicas prácticas en el tratamiento de enfermedades infecciosas (10,11).

En esta época se pensó que el diámetro de la zona de inhibición era proporcional a la sensibilidad, posteriormente se demostró que el tamaño de la zona de inhibición dependía de las propiedades físicoquímicas que determinan la velocidad de difusión en el agar "in vitro" y no está necesariamente relacionada a la actividad del antibiótico "in vivo" (10).

En 1953 Schensierson desarrolló una prueba semicuantitativa que utilizaba dos tubos de caldo con diferentes concentraciones, una alta y la otra baja. Los microorganismos altamente resistentes crecían en ambos tubos; los de susceptibilidad intermedia sólo crecían en el tubo de menor concentración y los muy sensibles no crecían en ninguno de los dos tubos. Esta prueba se modificó usando en vez de tubos, dos discos de papel filtro, uno de concentración alta y el otro de baja; los microorganismos resistentes crecían hasta el borde de los dos discos, los intermedios eran inhibidos por el disco de mayor concentración y los sensibles mostraban zonas de inhibición en ambos tubos (10).

Con el fin de poder proporcionar resultados más rápidos, o sea en 4 h, en 1956 Base y colaboradores desarrollaron un método utilizando agar sangre al 20 %, colocando sobre su superficie una capa de agar de infusión cerebro corazón conteniendo el microorganismo a probar (especialmente se usó este método para bacterias de rápido crecimiento), sobre esta capa de agar se colocan los discos con los antibióticos y después de 4 h se observa si hay cambio o no en el color del agar sangre alrededor de los discos, debido a la presencia de productos bacterianos que reducen a la hemoglobina, si el color de la sangre es igual al resto de la caja significa que la bacteria es resistente y si es más brillante es sensible al antibiótico (10).

A fines de la década de los 50, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana llevadas a cabo en los laboratorios clínicos, constituían un problema serio debido a que se carecía de un método patrón aceptable, ya que había variaciones en el empleo de las concentraciones de los antibióticos, medios de cultivo, técnicas de inoculación, tiempo de incubación y lectura de los resultados (10).

Anderson fue el primero en estandarizar la metodología, empleando soluciones patrones para las concentraciones en los discos, medio base de agar tripticasa soya, inóculo en una concentración aproximada de  $10^8$  microorganismos/ml, tiempo de incubación para el desarrollo de las bacterias y la difusión del antibiótico de 18 h, utilizando para la lectura de los resultados una regla e interpretando los halos conforme a una tabla de conversión (10).

Bauer y Kirby introdujeron en 1968 varias modificaciones en la prueba de Anderson, desarrollando la técnica que lleva su nombre y se acepta actualmente por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA); se usa como medio ideal el agar de Mueller-Hinton, la concentración del inóculo es la misma que la de Anderson, los discos de papel filtro son los llamados de "alto poder" para que se produzca una difusión homogénea y sea fácilmente reproducible (lo que no sucede con discos de baja concentración), el tiempo de incubación es de 18 a 24 h a 37° C y la lectura de los resultados se realiza midiendo los halos de inhibición con una regla a trasluz, interpretándose el tamaño del halo de inhibición en tablas (3,10).

#### a) METODO DE DISCO

Las bases que permitieron que el método de disco sea reproducible, se establecieron debido a que se tomó en cuenta lo siguiente:

##### ZONAS DE INHIBICION

Las variables que influyen en la formación de la zona de inhibición son la potencia del disco, que es la cantidad de antibiótico contenido en el disco y depende del volumen retenido, o sea que cuando se coloca sobre la superficie del agar inoculado, el disco absorbe agua del agar y el antibiótico se difunde; la concentración de éste depende del volumen de agua absorbida y la cantidad del antibiótico retenido en el disco, el antimicrobiano comienza a difundirse en tres dimensiones pero

esencialmente es en dos, hacia el fondo y lateralmente sobre la superficie del agar, momento en el cual se produce un cambio en el gradiente de concentración. Conforme pasa el tiempo, la concentración va disminuyendo y el diámetro de la zona se hace visible; por lo tanto, el valor de la difusión del antibiótico depende de varios factores como son la concentración de éste en el disco, tamaño y forma de la molécula, viscosidad del agar, temperatura de incubación y contenido iónico del medio. Bajo condiciones controladas se considera como un valor y se llama coeficiente de difusión (2.3).

Algunos antimicrobianos producen una zona de inhibición parcial que con el tiempo es difícil verla, otras presentan alrededor del disco una zona de inhibición completa, seguida de un anillo de crecimiento estimulado; se cree que esta área se forma debido a que hay una mayor disponibilidad de los nutrientes del medio para las células adyacentes, lo cual ocasiona un crecimiento de este tipo. A veces se observa entre la banda de inhibición completa y la de parcial, otra llamada de crecimiento retardado, que se debe a la inactivación del antibiótico por medio de enzimas extracelulares (3).

#### DENSIDAD DEL INOCULO

Es uno de los factores de más importancia, ya que si es pequeño, se requiere de mayor tiempo para alcanzar la población crítica que es la masa celular que puede ser inhibida por cierta cantidad del antibiótico bajo condiciones de prueba, la llamada

concentración crítica, y que da como resultado zonas muy grandes de inhibición. Por el contrario, si el inóculo es grande nos da una zona de inhibición pequeña, ya que la densidad del inóculo excede a la población crítica y no es suficiente la cantidad del antimicrobiano para inhibir su crecimiento (3).

#### CONCENTRACION DEL AGAR

Su contenido iónico influye en el coeficiente de difusión del antibiótico (3).

#### PROFUNDIDAD DEL AGAR

Cuando su grosor es muy pequeño sólo se difunde el antibiótico hacia los lados, dando como resultado un aumento en la zona de inhibición, por lo cual la profundidad recomendada es de 4 mm de espesor (2,3).

#### CAPACIDAD NUTRITIVA DEL AGAR

Influye a lo largo de la fase logarítmica y el tiempo de generación del microorganismo, ya que se ha demostrado que en un medio pobre da zonas grandes de inhibición debido a una prolongación de la fase lag presente, antes de que se inicie el crecimiento (3).

### TEMPERATURA DE INCUBACION

Favorece el crecimiento bacteriano, la difusión del antimicrobiano y su estabilidad, cuando es la adecuada; si no es así, puede inactivarse con los cambios de temperatura (3).

### TIEMPO DE APLICACION DEL DISCO

Antes de colocarse los discos se debe esperar cierto tiempo, a fin de que el inóculo se impregne en el agar (3).

### TIEMPO DE INCUBACION

La posición de la zona de inhibición se determina en las primeras horas, pero se recomienda que se lea a las 18 h, no después de este tiempo, ya que el diámetro puede disminuir debido a la presencia de un crecimiento retardado, como consecuencia de inhibición parcial de éste o a la presencia de variantes resistentes. En otros casos puede suceder al contrario, de que sea grande en las primeras horas debido a una lisis celular (3).

#### **b. METODO DE DILUCION**

Con el objeto de determinar la susceptibilidad de un microorganismo en forma cuantitativa y para obtener un manejo adecuado del antibiótico en la quimioterapia, se puede recurrir a las pruebas de dilución en caldo o en agar, que se usan para

determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se requiere para inhibir el crecimiento bacteriano (12,13,14,15).

Para llevar a cabo la técnica de dilución en caldo se emplean una serie de tubos para cada cepa y por antibiótico. La técnica es conveniente cuando se prueban pocas cepas, debido a la gran cantidad de material de vidrio que se requiere. por esta razón actualmente se lleva a cabo un micrométodo automatizado, donde se usan placas de microdilución y asas calibradas. La lectura de la CMI en este método, es la dilución que no presente turbidez y se considera como la CMI de esa cepa a ese determinado antibiótico (13,14).

También se puede determinar por el método de dilución en agar, donde se inoculan las cepas con el replicador de inóculo de Steers; con este método se pueden probar simultáneamente 32 cepas diferentes con la ventaja de poder detectar si la cepa está contaminada, debido al tipo de crecimiento diferente en la superficie del agar. La lectura de la CMI será la más baja concentración del antibiótico en la que no se observa crecimiento (13,15,16).

GENERO SALMONELLA

Incluidos en el género Salmonella, tribu Salmonellae y familia Enterobacteriaceae, se encuentran aquellos bacilos gruesos y cortos, móviles por medio de flagelos peritricos (salvo contadas excepciones), no esporulados, no capsulados, aerobios o facultativos; aislados, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas (17).

Según Borman, Stuart y Wheeler (1944), sugerían que el género Salmonella estaba limitado a 3 especies (S. choleraesuis, mejor conocida como "entérica", S. typhi y S. kauffmannii) (17).

Kauffman y Edwards en 1952, basándose en el comportamiento bioquímico y serológico, sugirieron que estas 3 especies quedaran dentro de un mismo nombre "entérica" (17).

Estudios de la relación de las bases del ácido desoxirribonucleico (ADN) de estas bacterias, clasifican a las salmonelas de otro modo como ha sido propuestos por Le Minor del Instituto Pasteur de París (1982) y Brenner del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (1983):

- 1 . Salmonella enterica subespecie enterica
- 2 . Salmonella enterica subespecie galanae
- 3a. Salmonella enterica subespecie arizonae
- 3b. Salmonella enterica subespecie diarizonae
- 4 . Salmonella enterica subespecie houtanae
- 5 . Salmonella enterica subespecie bonori

En general, las subespecies son productoras de ácido sulfhídrico, la reacción de rojo de metilo es positiva, descarboxilan los aminoácidos lisina, arginina y ornitina, no forman indol, no hidrolizan la urea, la prueba de Voges- Proskauer es negativa y no desaminan la fenilalanina (17).

Existen diferencias bioquímicas importantes entre estas 6 subespecies las cuales se resumen en el Cuadro # 1 (17).

La gran mayoría de las salmonelas se encuentran en forma natural en animales que constituyen el reservorio para la infección en humanos. Entre los animales más importantes tenemos a las gallinas, pollos, pavos, patos, puercos, vacas, peces y con menor importancia a loros, tortugas, roedores, focas, pulgas, búfalos, ballenas, perros y gatos (18).

Los humanos se infectan casi únicamente mediante el consumo de alimentos o bebidas contaminadas. Los alimentos comúnmente responsables comprenden pasteles con crema, embutidos, carnes preparadas comercialmente, huevos, leche, quesos, cremas. La contaminación de éstos puede deberse a 3 diferentes mecanismos:

1. de animal a animal
2. de animal a persona
3. de persona a persona

Las infecciones por salmonelas se pueden evitar tomando medidas como son :

- Una cocción adecuada de los alimentos de procedencia animal
- Protección de los alimentos para evitar la contaminación por roedores, moscas y otros animales
- Inspección periódica de las personas que manipulan alimentos
- Métodos adecuados de producción y elaboración de los alimentos
- Buena salud del personal y aplicación de prácticas higiénicas (18).

## CUADRO No. 1

DIFERENCIACION DE LAS SUBESPECIES DE *SALMONELLA*

| SUBESPECIES DE <i>Salmonella</i> |       |       |          |       |   |
|----------------------------------|-------|-------|----------|-------|---|
| PRUEBA o SUSTRATO                | 1     | 2     | 3a y 3b* | 4     | 5 |
| KCN                              | -     | -     | -        | -     | - |
| Gelatina (Kohn)                  | -     | (+)   | (+) o -  | +     | + |
| Lactosa                          | -     | -     | V        | -     | - |
| Dulcitol                         | + o - | +     | -        | -     | + |
| Salicina                         | -     | -     | -        | -     | + |
| Inositol                         | - o + | - o + | -        | -     | - |
| Malonato                         | -     | +     | +        | -     | - |
| Mucato                           | + o - | +     | + o -    | -     | + |
| Jordan D-tartrato                | + o - | + o - | -        | + o - | - |
| Beta-galactosidasa               | -     | - o + | +        | -     | + |

- (+) Reacción positiva después de 3 o más días.  
 + o - Muchos cultivos son positivos; algunos negativos.  
 - o + Muchas especies son negativas; algunas positivas.  
 V Variable.

\* Las únicas diferencias entre 3a y 3b es que la primera es monofásica, lactosa negativa o fermentadora lenta y la segunda es difásica y fermenta rápidamente la lactosa (17).

## MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL BIOLÓGICO

200 cepas de Salmonella spp que las proporcionó el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría, aisladas de muestras de niños hospitalizados y de consulta externa.

## CEPAS TIPO

E. coli ATCC 25922

S. aureus ATCC 25923

P. aeruginosa ATCC 27853

## MATERIAL DE LABORATORIO

- cajas Petri de 15 x 150 mm de vidrio
- cajas Petri de 15 x 100 mm desechables
- asa de alambre
- pipetas de 10 ml graduadas en ml
- pipetas de 5 ml graduadas en ml
- pipetas de 1 ml graduadas en ml
- pipetas Pasteur
- mechero
- tubos de ensaye de 16 x 150 mm
- tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca
- hisopos de algodón
- pinzas Millipore
- regla
- gradilla
- matraces Erlenmeyer de 125 ml
- matraces aforados

## EQUIPO ESPECIAL DE LABORATORIO

- replicador de inóculo de Steers
- estufa de incubación a 37 C
- autoclave
- fuente luminosa
- mesa nivelada
- potenciómetro
- balanza analítica

## MEDIOS DE CULTIVO

- agar Mac Conkey (Merck 5465)
- agar Mueller-Hinton (Merck 5437)
- caldo Tripticasa Soya (Bioxon 111-1)

## ANTIBIOTICOS

- sal de ampicilina pura (donada por la Cía Bristol)
- sal de amikacina pura (donada por la Cía Bristol)
- sal de cloranfenicol pura (donada por la Cía Bristol)
- sal de gentamicina pura (donada por la Cía Scheramex)
- discos de ampicilina 10 mcg/ml (BBL 31264)
- discos de amikacina 10 mcg/ml (BBL 31597)
- discos de cloranfenicol 30 mcg/ml (BBL 31274)
- discos de gentamicina 10 mcg/ml (Scheramex 4958)

## REACTIVOS

- solución de cloruro de bario al 1 % (Técnica Química C1320)
- Acido sulfúrico al 1 % (Merck 1/15851)
- solución de cloruro de sodio al 0.85 % (Técnica Química C1540)
- etanol (Merck 15853)
- fosfato monobásico de potasio (Merck 4873)
- fosfato dibásico de potasio (Técnica Química F1260)
- agua destilada

## METODOLOGIA

## A. COMPROBACION DE LA PUREZA DE LAS CEPAS

Las 200 cepas de Salmonella spp. proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría, se encontraban sembradas en el medio de conservación Dorset, que es a base de huevo (17).

Se procedió a verificar su pureza sembrándolas en agar Mac Conkey, las que presentaban diferentes tipos de colonias se desechaban y solamente se trabajaron las cepas que se observaban con crecimiento uniforme.

## B. PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI PARA LA DETERMINACION DE LA CMI

Se utilizaron cajas de Petri de 15 x 100 mm desechables, con agar Mueller-Hinton, para la determinación de la CMI, empleándose diferentes diluciones de cada antibiótico.

Para ello, a tubos con medio de Mueller-Hinton sin gelificar, con un volumen de 13 ml y conservados en baño maría a 50°C se les añadió 1.44 ml de las diferentes concentraciones de los antibióticos de prueba, que comprendían de 0.6 a 100 mcg/ml. Las diluciones empleadas fueron al doble y se prepararon conforme al esquema # 1 y los cuadros # 2 y 3.

Se incluyó además un tubo control que contenía agua destilada en lugar de la dilución del antibiótico, para verificar la calidad del medio.

C U A D R O # 2

PREPARACION DE LAS DILUCIONES CON CONCENTRACIONES DIVERSAS DE LOS ANTIBIOTICOS (2)

| SOLUCION TIPO (mcg/ml) | VOLUMEN ANTIBIOTICO (ml) | VOLUMEN AGUA (ml) | CONCENTRACION FINAL (mcg/ml) |
|------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------------|
| 1,000                  | 10                       | 0                 | 1,000                        |
| 1,000                  | 5                        | 5                 | 500                          |
| 500                    | 5                        | 5                 | 250                          |
| 1,000                  | 1                        | 9                 | 100                          |
| 100                    | 5                        | 5                 | 50                           |
| 50                     | 5                        | 5                 | 25                           |
| 25                     | 5                        | 5                 | 12.5                         |
| 12.5                   | 5                        | 5                 | 6.25                         |

C U A D R O # 3

PREPARACION DE LAS DILUCIONES CON CONCENTRACIONES DIVERSAS DE LOS ANTIBIOTICOS

| SOLUCION TIPO (mcg/ml) | VOLUMEN ANTIBIOTICO (ml) | VOLUMEN AGUA (ml) | CONCENTRACION FINAL (mcg/ml) |
|------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------------|
| 1,000                  | 1.44                     | 13                | 100                          |
| 500                    | 1.44                     | 13                | 50                           |
| 250                    | 1.44                     | 13                | 25                           |
| 100                    | 1.44                     | 13                | 10.5                         |
| 50                     | 1.44                     | 13                | 5.0                          |
| 25                     | 1.44                     | 13                | 2.5                          |
| 12.5                   | 1.44                     | 13                | 1.25                         |
| 6.25                   | 1.44                     | 13                | 0.60                         |



## A. METODO DE DISCO DE KIRBY-BAUER (3)

### 1. PUREZA DE LAS COLONIAS

Se sembraron todas las cepas del estudio en agar Mac Conkey, con objeto de tener colonias aisladas.

### 2. PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI

Se utilizaron cajas de Petri de vidrio de 15 x 150 mm con 45 ml del agar Mueller-Hinton.

### 3. ESTANDARIZACION DEL INOCULO

Con un asa de alambre se tomaron de 2 a 5 colonias aisladas del microorganismo a probar y se inocularon en un tubo de ensaye que contenia 4 ml de caldo Trypticase Soya. Se incubaron de 2 a 5 h a 37° C. a fin de obtener una suspensión bacteriana equivalente a 10<sup>8</sup> microorganismos/ml o sea la correspondiente a un tubo que contenga 0.5 ml de cloruro de bario al 1 % y 9.5 ml de ácido sulfúrico al 1 %. En el caso de que la suspensión bacteriana sea más turbia, se diluye con solución de cloruro de sodio al 0.85 % estéril, hasta obtener la misma turbidez que el patrón.

### 4. INOCULACION DE LAS PLACAS

Se empleó un hisopo de algodón estéril empapado con la suspensión del microorganismo a probar, suprimiendo el exceso de la suspensión, al exprimir el hisopo contra las paredes del tubo.

Se sembró abarcando toda la superficie de la placa de agar en diferentes direcciones.

#### 5. APLICACION DE LOS DISCOS

Se dejó secar el inóculo de 3 a 5 min. y se colocaron los discos impregnados con los diferentes antibióticos en el agar, por medio de unas pinzas Millipore, asegurándose de que hubiera un buen contacto con el agar para que el antibiótico comenzara a difundirse.

#### 6. INCUBACION DE LAS CAJAS

Se incubaron de 18 a 24 h a 37° C o toda la noche.

#### 7. LECTURA DE LOS RESULTADOS

Después del tiempo de incubación se midieron los diámetros de las zonas de inhibición, tomando como punto de partida la orilla del disco hasta donde se presentó un leve crecimiento. La lectura obtenida en mm se comparó con las tablas establecidas de Kirby-Bauer para cada antibiótico, reportándolas como sensible, intermedia o resistente, según la lectura obtenida.

## B. METODO DE DILUCION EN PLACA DE AGAR (13)

Emplea diferentes concentraciones del antibiótico en el agar

### 1. PREPARACION DE DILUCIONES DEL ANTIBIOTICO

Se realizaron en una concentración 10 veces mayor que la deseada en la prueba final. Ver esquema # 1 y cuadros # 2 y 3.

### 2. INCORPORACION DE LAS DILUCIONES AL AGAR

Teniendo el agar de Mueller-Hinton a 50° C se le adicionó 1.44 ml de la dilución del antibiótico a 13 ml del agar en un tubo, se mezcló por inversión varias veces, se vació en una caja Petri de 15 x 100 mm desechables, y se colocó sobre una mesa nivelada dejándolas enfriar.

### 3. ESTANDARIZACION DEL INOCULO

Se realizó del mismo modo como en el método de disco.

### 4. INOCULACION DE LAS PLACAS

Se realizó por medio del replicador de Steers, el cual consta principalmente de 4 partes metálicas, una base, un soporte perpendicular a ella y dos placas, una portadora de los inóculos y una inoculadora. La base está constituida a su vez por dos secciones, una fija y una móvil que se desliza de un lado a otro sobre la anterior. La parte móvil presenta dos depresiones laterales de forma circular, en las cuales se colocan las cajas Petri con el medio de cultivo adicionado del antimicrobiano y un compartimiento central para la placa

portadora de los inóculos. Esta placa presenta 32 orificios que se utilizan para depositar las suspensiones bacterianas a probar. Dicha placa puede separarse del aparato para esterilizarse o llenar los orificios. La placa inoculadora está fija en el soporte y presenta 32 puntas para inocular que coinciden con la posición de los orificios de la placa portadora y que sirven para recoger los inóculos de los mismos (16).

Se deben de utilizar, cada vez que se corra la prueba 3 cepas control ATCC de E. coli 25922, P. aeruginosa 27853 y S. aureus 25923.

Se marcaron las cajas con un punto grueso para indicar la parte superior de la placa inoculadora.

Se inocularon las cajas de mayor a menor concentración del mismo antibiótico, teniendo cuidado de no dejar caer gotas sobre la placa. Se dejó absorber el inóculo de 3 a 5 min.

##### 5. INCUBACION DE LAS PLACAS

Se incubaron de 18 a 24 h a 37° C o toda la noche.

##### 6. LECTURA DE LOS RESULTADOS

Después del tiempo de incubación se examinaron las cajas para determinar la CMI del antibiótico, que fue la necesaria para inhibir el crecimiento visible del microorganismo o sea la concentración más baja del antibiótico que no presenta desarrollo bacteriano y se reportó en mcg/ml .

### C. COEFICIENTES DE CORRELACION

Para cada antibiótico, una vez obtenidos los resultados de las dos pruebas, se graficarán los diámetros de las zonas de inhibición en el eje de las "x" y los valores de las CMI en el de las "y", y por medio de la ecuación de mínimos cuadrados se obtendrán los coeficientes de regresión lineal (19,20).

Se graficarán de la misma manera los resultados obtenidos para determinar los cuadrantes de falsos sensibles y falsos resistentes. La línea que determina los resistentes o los sensibles será aquella que se obtiene de los datos farmacocinéticos de actividad del antibiótico y se denominará  $M_n$ . Las líneas verticales denominadas  $Z_n$  y  $Z_n$  serán las que determinan las tablas de Kirby-Bauer, como halos de inhibición que correspondan a una sensibilidad intermedia. Las falsas resistentes serán las del cuadrante inferior a la línea  $M_n$  y a la izquierda de la  $Z_n$  y las falsas sensibles son las del cuadrante superior a la  $M_n$  y a la derecha de  $Z_n$  (21).

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos por la técnica de Kirby-Bauer para los cuatro antibióticos estudiados, se muestran en el cuadro # 4 donde aparece el porcentaje de cepas resistentes, de sensibilidad intermedia y sensibles.

La amikacina fue el antibiótico al que casi todas las cepas fueron sensibles, siguiéndole en orden de frecuencia la gentamicina, la ampicilina y el cloranfenicol (cuadro #4).

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA SENSIBILIDAD A AMIKACINA, AMPICILINA, CLORANFENICOL Y GENTAMICINA DE 200 CEPAS DE SALMONELLA SPP SEGUN EL HALO DE INHIBICION.

| ANTIBIOTICO   | SENSIBILIDAD SEGUN EL HALO DE INHIBICION |            |          |
|---------------|--|------------|----------|
|               | RESISTENTE                               | INTERMEDIA | SENSIBLE |
| AMIKACINA     | 1.0                                      | 0.0        | 99.0     |
| AMPICILINA    | 48.0                                     | 0.5        | 51.5     |
| CLORANFENICOL | 51.5                                     | 1.0        | 47.5     |
| GENTAMICINA   | 31.0                                     | 5.5        | 63.5     |

CUADRO No. 4

Los cuadros 5, 6, 7 y 8 muestran el número de cepas y su comportamiento, de acuerdo a los halos inhibición para amikacina, ampicilina, gentamicina y cloranfenicol, mostrándose al mismo tiempo el porcentaje acumulado. La representación gráfica de

estos resultados se observan en las gráficas 1, 2, 3 y 4 respectivamente donde están señalados los límites considerados como sensibles, intermedios y resistentes conforme a los halos de inhibición.

FRECUENCIA DE CEPAS SEGUN EL HALO DE INHIBICION OBTENIDO CON LOS ANTIBIOTICOS Y EXPRESADA EN PORCENTAJE ACUMULADO.

| A M I K A C I N A  |                 |                      |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| HALO DE INHIBICION | NUMERO DE CEPAS | PORCENTAJE ACUMULADO |
| 13                 | 1               | 0.5                  |
| 14                 | 1               | 1.0                  |
| 17                 | 2               | 2.0                  |
| 18                 | 2               | 3.0                  |
| 19                 | 9               | 7.5                  |
| 20                 | 19              | 17.0                 |
| 21                 | 17              | 25.5                 |
| 22                 | 24              | 37.5                 |
| 23                 | 33              | 54.0                 |
| 24                 | 37              | 72.5                 |
| 25                 | 23              | 84.0                 |
| 26                 | 21              | 94.5                 |
| 27                 | 6               | 97.5                 |
| 28                 | 2               | 98.5                 |
| 30                 | 3               | 100.0                |

CUADRO No. 5

| AMPICILINA         |                 |                      |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| HALO DE INHIBICION | NUMERO DE CEPAS | PORCENTAJE ACUMULADO |
| 6                  | 95              | 47.5                 |
| 10                 | 1               | 48.0                 |
| 12                 | 1               | 48.5                 |
| 14                 | 1               | 49.0                 |
| 15                 | 3               | 50.5                 |
| 16                 | 5               | 53.0                 |
| 17                 | 5               | 55.5                 |
| 18                 | 8               | 59.5                 |
| 19                 | 8               | 63.5                 |
| 20                 | 22              | 74.5                 |
| 21                 | 20              | 84.5                 |
| 22                 | 17              | 93.0                 |
| 23                 | 6               | 96.0                 |
| 24                 | 5               | 98.5                 |
| 25                 | 1               | 99.0                 |
| 26                 | 1               | 99.5                 |
| 28                 | 1               | 100.0                |

CUADRO No. 6

| CLORANFENICOL      |                 |                      |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| HALO DE INHIBICION | NUMERO DE CEPAS | PORCENTAJE ACUMULADO |
| 6                  | 100             | 50.0                 |
| 10                 | 1               | 50.5                 |
| 11                 | 1               | 51.0                 |
| 12                 | 1               | 51.5                 |
| 16                 | 1               | 52.0                 |
| 17                 | 1               | 52.5                 |
| 20                 | 6               | 55.5                 |
| 21                 | 2               | 56.5                 |
| 22                 | 13              | 63.0                 |
| 23                 | 14              | 70.0                 |
| 24                 | 14              | 77.0                 |
| 25                 | 24              | 89.0                 |
| 26                 | 10              | 94.0                 |
| 27                 | 4               | 96.0                 |
| 29                 | 7               | 99.5                 |
| 34                 | 1               | 100.0                |

CUADRO No. 7

| GENTAMICINA        |                 |                      |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| HALO DE INHIBICION | NUMERO DE CEPAS | PORCENTAJE ACUMULADO |
| 6                  | 33              | 16.5                 |
| 8                  | 1               | 17.0                 |
| 9                  | 2               | 18.0                 |
| 10                 | 10              | 23.0                 |
| 11                 | 10              | 28.0                 |
| 12                 | 6               | 31.0                 |
| 13                 | 9               | 35.5                 |
| 14                 | 2               | 36.5                 |
| 16                 | 1               | 37.0                 |
| 17                 | 2               | 38.0                 |
| 18                 | 6               | 41.0                 |
| 19                 | 12              | 47.0                 |
| 20                 | 32              | 63.0                 |
| 21                 | 26              | 76.0                 |
| 22                 | 19              | 85.5                 |
| 23                 | 22              | 96.5                 |
| 24                 | 3               | 98.0                 |
| 25                 | 4               | 100.0                |

CUADRO No. 8

Las CMI's obtenidas para los 4 antibióticos estudiados, expresados como porcentaje de cepas resistentes y sensibles, se observan en los cuadros 9 y 10.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA SENSIBILIDAD A AMIKACINA, AMPICILINA, CLORANFENICOL Y GENTAMICINA DE 200 CEPAS DE SALMONELLA SPP SEGUN LA CMI.

| ANTIBIOTICO   | CONCENTRACION DE ANTIBIOTICO EN mcg |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|               | 0.6                                 | 1.25 | 2.5  | 5.0  | 10.0 | 25.0 | 50.0 | 100  |
| AMIKACINA     | 0.0                                 | 3.5  | 9.0  | 22.0 | 40.5 | 12.0 | 1.0  | 4.0  |
| AMPICILINA    | 0.0                                 | 1.5  | 2.0  | 6.0  | 9.0  | 13.0 | 7.0  | 61.5 |
| CLORANFENICOL | 0.5                                 | 0.0  | 0.5  | 19.5 | 8.0  | 7.5  | 0.5  | 63.5 |
| GENTAMICINA   | 8.0                                 | 25.5 | 13.5 | 4.0  | 2.5  | 6.0  | 9.0  | 35.5 |

CUADRO No. 9

DISTRIBUCION DE PORCENTAJE ACUMULADO DE LA SENSIBILIDAD A AMIKACINA, AMPICILINA, CLORANFENICOL Y GENTAMICINA DE 200 CEPAS DE SALMONELLA SPP SEGUN LA CMI.

| ANTIBIOTICO   | CONCENTRACION DE ANTIBIOTICO EN mcg |      |      |      |      |      |      |     |
|---------------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|
|               | 0.6                                 | 1.25 | 2.5  | 5.0  | 10.0 | 25.0 | 50.0 | 100 |
| AMIKACINA     | 0.0                                 | 3.5  | 12.5 | 34.5 | 83.0 | 95.0 | 96.0 | 100 |
| AMPICILINA    | 0.0                                 | 1.5  | 3.5  | 9.5  | 18.5 | 31.5 | 38.5 | 100 |
| CLORANFENICOL | 0.5                                 | 0.5  | 1.0  | 20.5 | 28.5 | 36.5 | 36.5 | 100 |
| GENTAMICINA   | 8.0                                 | 33.5 | 47.0 | 51.0 | 53.5 | 59.5 | 64.5 | 100 |

CUADRO No. 10

NOTA "Los números en negrillas corresponden a las cepas resistentes que se presentaron para cada antibiótico según su  $M_n$ ".

El antibiótico que resultó con menor efecto bactericida fue la ampicilina, de acuerdo a su  $M_n$  que es el valor que nos determina resistente o sensible y permite obtener los datos farmacocinéticos de actividad del antibiótico, que para ampicilina es de 2.0, siguiendo en este orden cloranfenicol ( $M_n$  8.0), amikacina y gentamicina ( $M_n$  10.0).

La representación gráfica de estos resultados expresados en porcentaje acumulado se observa en las gráficas 5, 6, 7, y 8.

Como se había propuesto obtener una recta determinada por el método de mínimos cuadrados, los resultados obtenidos mostraron un coeficiente de correlación para amikacina de -0.20, ampicilina -0.62, cloranfenicol -0.65 y gentamicina -0.82, por los cuales no fue posible trazar la línea y únicamente se utilizó el método de los cuadrantes para obtener el porcentaje de cepas sensibles.

resistentes, falsos sensibles, falsos resistentes e intermedias. Cuando se correlacionaron los datos de la CMI para la amikacina con los de la sensibilidad de Kirby-Bauer por el método de disco, sólo en el 34.5 % hubo correlación por los dos métodos, aunque en el 34 % de las cepas la correlación fué de sensibilidad y sólo el 0.5% de resistencias. Por el método de disco hubo falsas susceptibles en el 65% y falsas resistentes en 0.5 % (cuadro # 11).

CORRELACION DE PORCENTAJES ACUMULADOS DE CMI Y LOS DIAMETROS DE ZONA DE INHIBICION DE AMIKACINA

| SENSIBILIDAD<br>POR DISCO | SENSIBILIDAD POR<br>C M I |      |
|---------------------------|---------------------------|------|
|                           | R                         | S    |
| R                         | 0.5                       | 0.5  |
| I                         | 0.0                       | 0.0  |
| S                         | 65.0                      | 34.0 |

CUADRO No. 11

La representación gráfica de estos resultados se observa en la gráfica 9, dividida en cuadrantes expresando en el eje de las abscisas la CMI y en el eje de las ordenadas los diámetros de los halos de inhibición, donde en el cuadrante de las susceptibles se encuentra el 34 %, en el cuadrante de las resistentes el 0.5 %, en el de los falsos sensibles el 65 % y en el de los falsos resistentes el 0.5 %.

Para la ampicilina en el 47.5 % de las cepas hubo correlación, el 47 % fué para la resistencia y el 0.5 % para las sensibles.

También se presentaron falsos susceptibles en el 51 %, falsos resistentes en el 1 %, el 0.5 % restante de las cepas fueron de sensibilidad intermedia por el método de disco (cuadro 12) y estos resultados se muestran en la gráfica 10.

**CORRELACION DE PORCENTAJES ACUMULADOS DE CMI Y LOS DIAMETROS DE ZONA DE INHIBICION DE AMPICILINA**

| SENSIBILIDAD<br>POR DISCO | SENSIBILIDAD POR<br>C M I |     |
|---------------------------|---------------------------|-----|
|                           | R                         | S   |
| R                         | 47.0                      | 1.0 |
| I                         | 0.5                       | 0.0 |
| S                         | 51.0                      | 0.5 |

CUADRO No.12

En la correlación del cloranfenicol el 69 % de las cepas presentó correlación para ambos métodos, el 50 % correspondió a copas resistentes y el 19 % a las sensibles, hubo falsos sensibles en el 28.5 % y falsos resistentes en el 1.5 % y el 1 % para cepas con sensibilidad intermedia (cuadro 13). Estos valores antes mencionados se observan en la gráfica 11.

CORRELACION DE PORCENTAJES ACUMULADOS DE CMI Y LOS DIAMETROS DE ZONA DE INHIBICION DE CLORANFENICOL

| SENSIBILIDAD<br>POR DISCO | SENSIBILIDAD POR<br>C M I |      |
|---------------------------|---------------------------|------|
|                           | R                         | S    |
| R                         | 50.0                      | 1.5  |
| I                         | 1.0                       | 0.0  |
| S                         | 28.5                      | 19.0 |

CUADRO No. 13

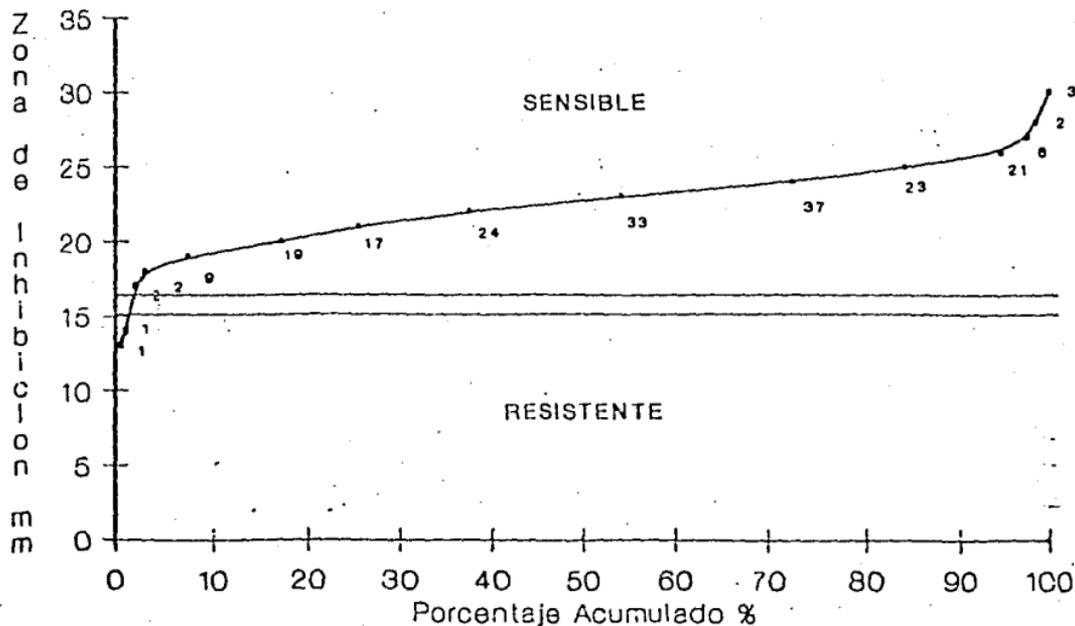
En la gentamicina, su correlación por ambos métodos fué de 80.5 %, el 50 % de las cepas presentaron sensibilidad y el 30.5 % resistencia, se observaron también falsos sensibles en el 13.5 %, falsos resistentes en el 0.5 % y de sensibilidad intermedia el 5.5 % (cuadro 14).

CORRELACION DE PORCENTAJES ACUMULADOS DE CMI Y LOS DIAMETROS DE ZONA DE INHIBICION DE GENTAMICINA

| SENSIBILIDAD<br>POR DISCO | SENSIBILIDAD POR<br>C.M.I. |      |
|---------------------------|----------------------------|------|
|                           | R                          | S    |
| R                         | 30.5                       | 0.5  |
| I                         | 5.0                        | 0.5  |
| S                         | 13.5                       | 50.0 |

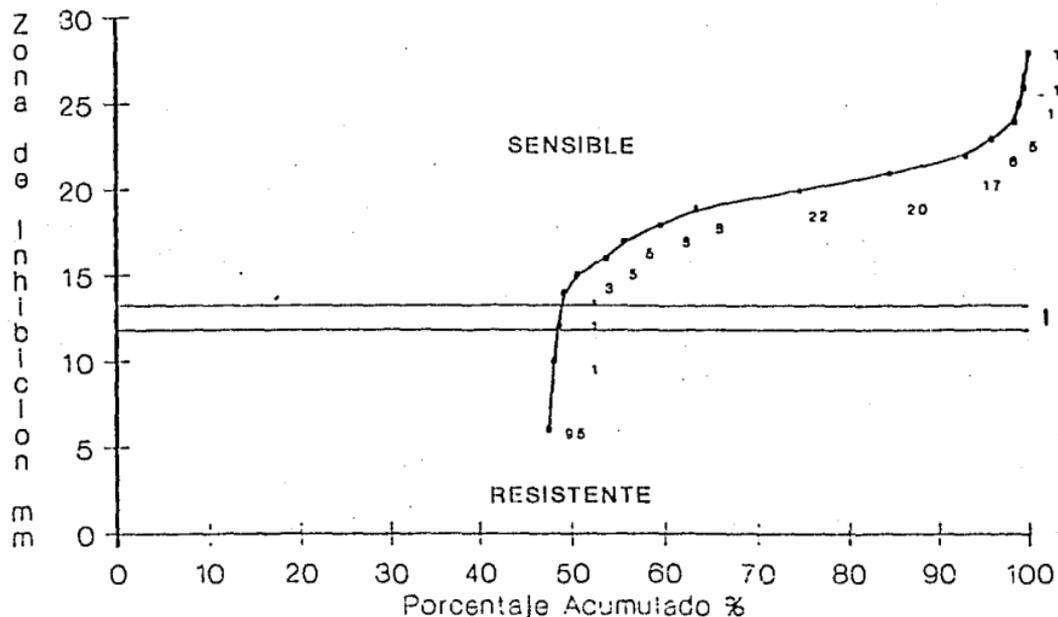
CUADRO No. 14

**PORCENTAJE ACUMULADO DE LOS HALOS DE  
INHIBICION DE AMIKACINA EXPRESADOS EN  
mm DE 200 CEPAS DE *Salmonella* spp  
(KIRBY BAUER)**



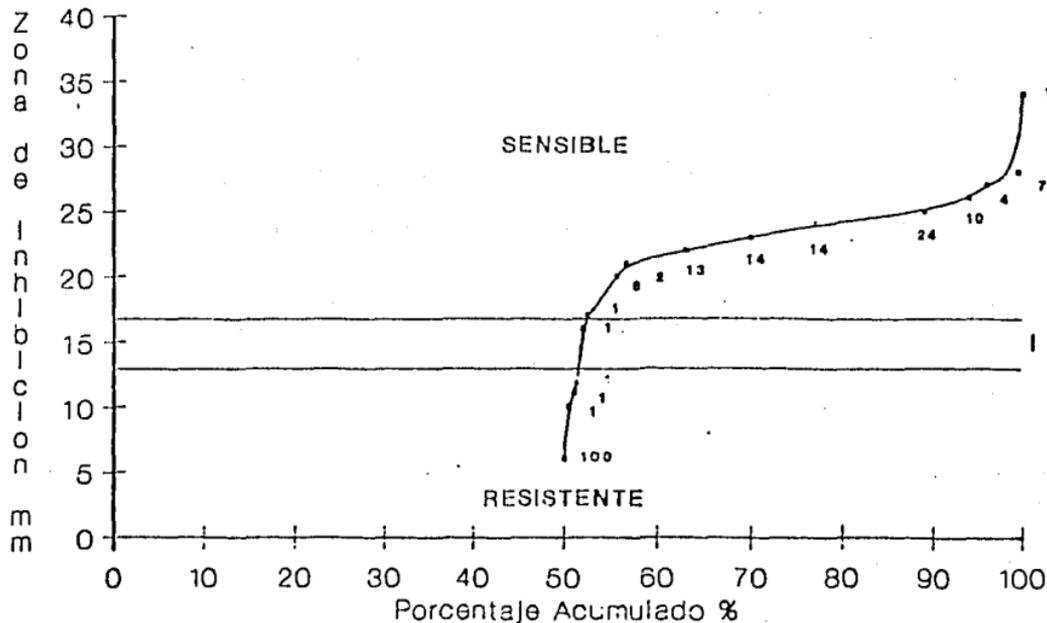
I - INTERMEDIA

PORCENTAJE ACUMULADO DE LOS HALOS DE  
 INHIBICION DE AMPICILINA EXPRESADOS EN  
 mm DE 200 CEPAS DE Salmonella spp  
 (KIRBY BAUER)



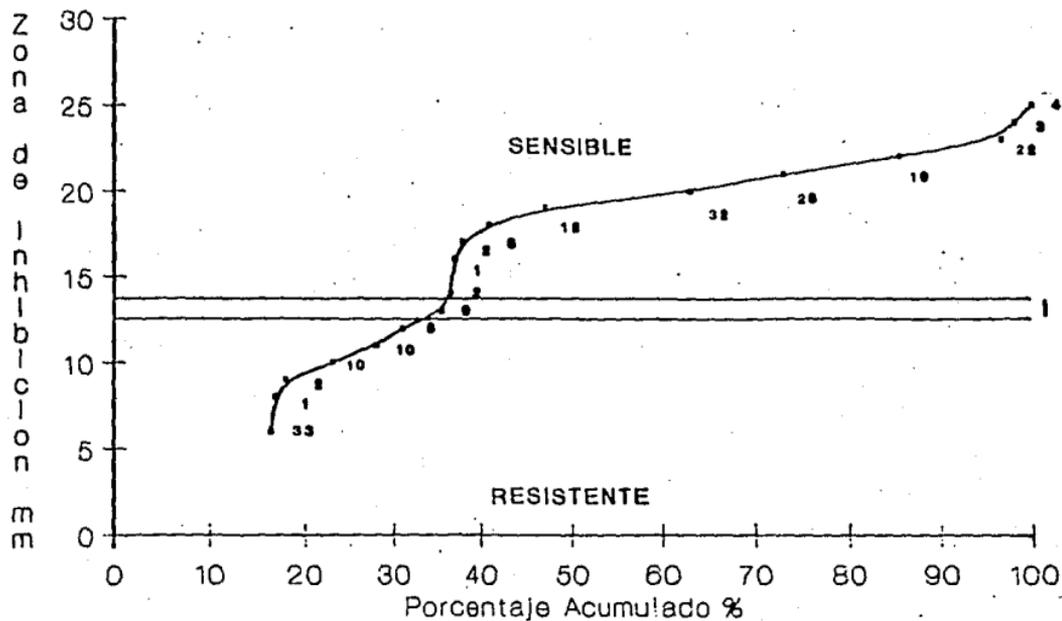
I - INTERMEDIA

**PORCENTAJE ACUMULADO DE LOS HALOS DE  
INHIBICION DE CLORANFENICOL EXPRESADOS  
EN mm DE 200 CEPAS DE Salmonella spp  
(KIRBY BAUER)**



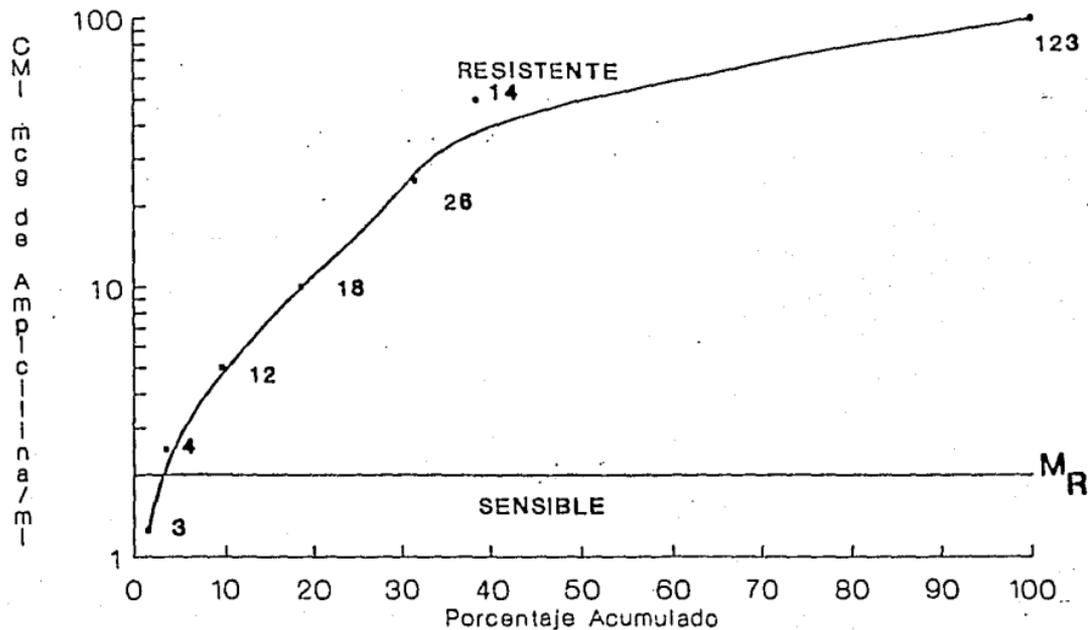
I - INTERMEDIA

**PORCENTAJE ACUMULADO DE LOS HALOS DE  
INHIBICION DE GENTAMICINA EXPRESADOS  
EN mm DE 200 CEPAS DE Salmonella spp  
(KIRBY BAUER)**

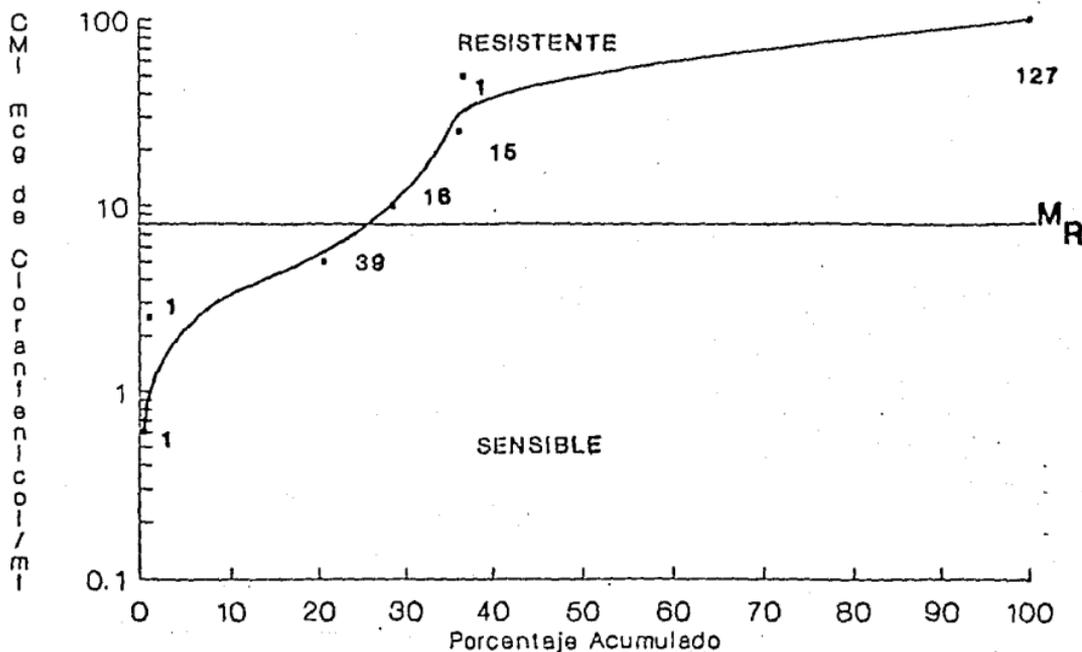


1 - INTERMEDIA

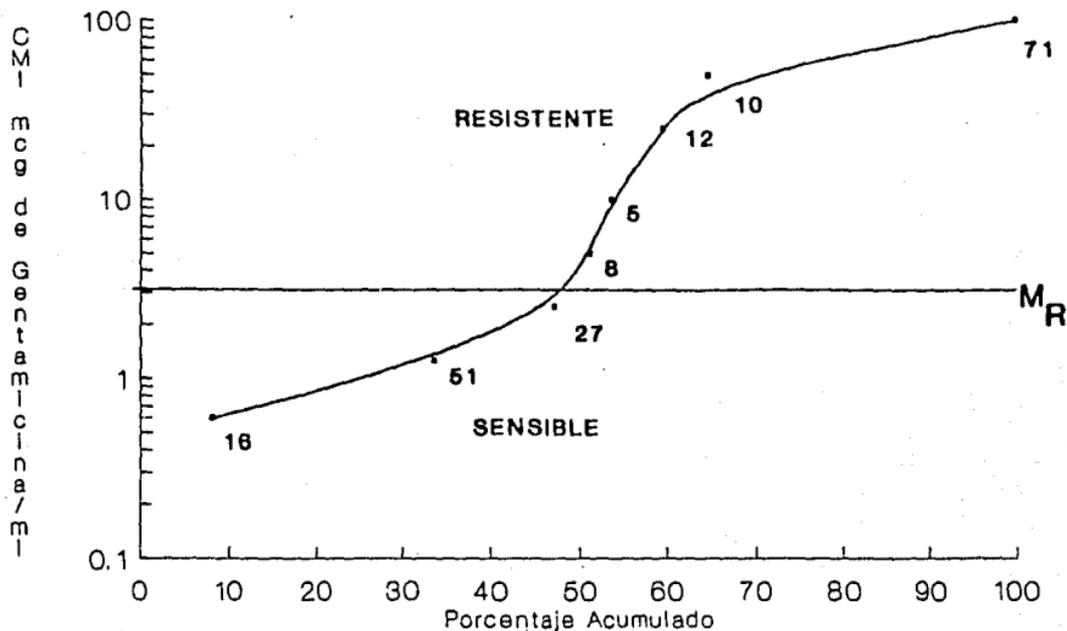
DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE CMI DE  
AMPICILINA SEGUN PORCENTAJE ACUMULADO  
DE 200 CEPAS DE Salmonella spp



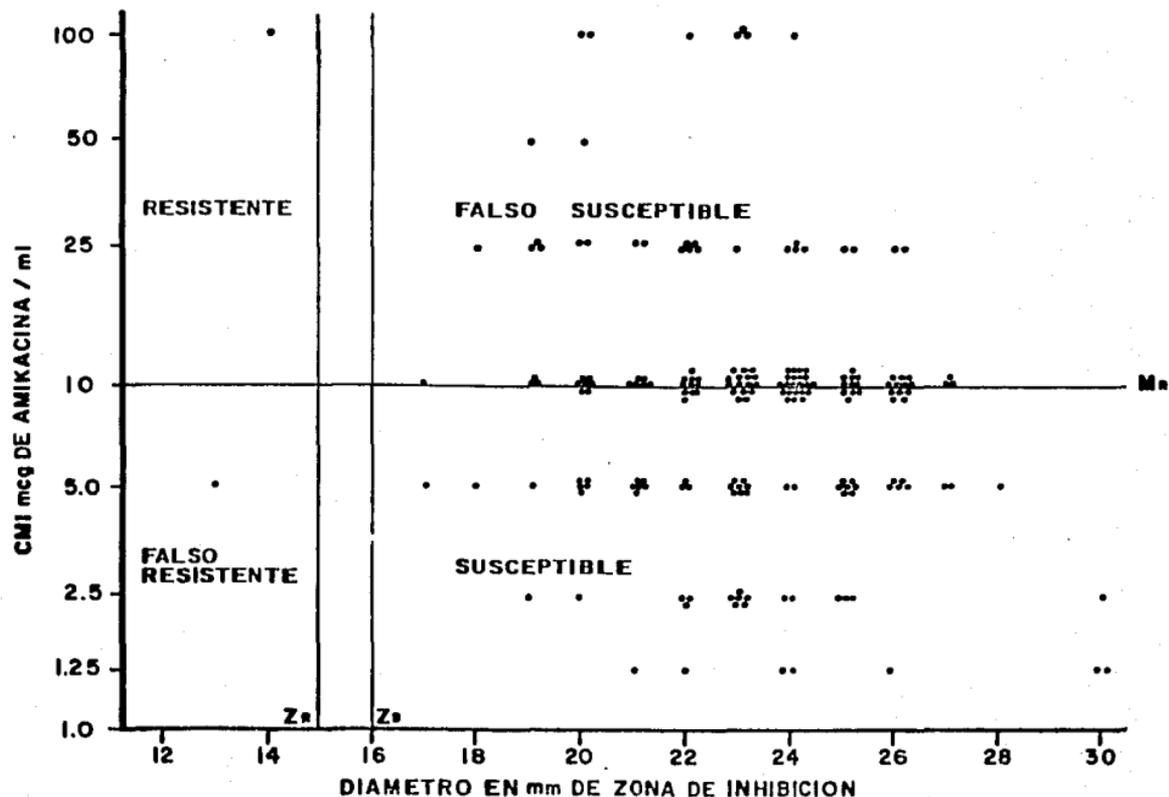
**DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE CMI DE  
CLORANFENICOL SEGUN PORCENTAJE ACUMULADO  
DE 200 CEPAS DE Salmonella spp**



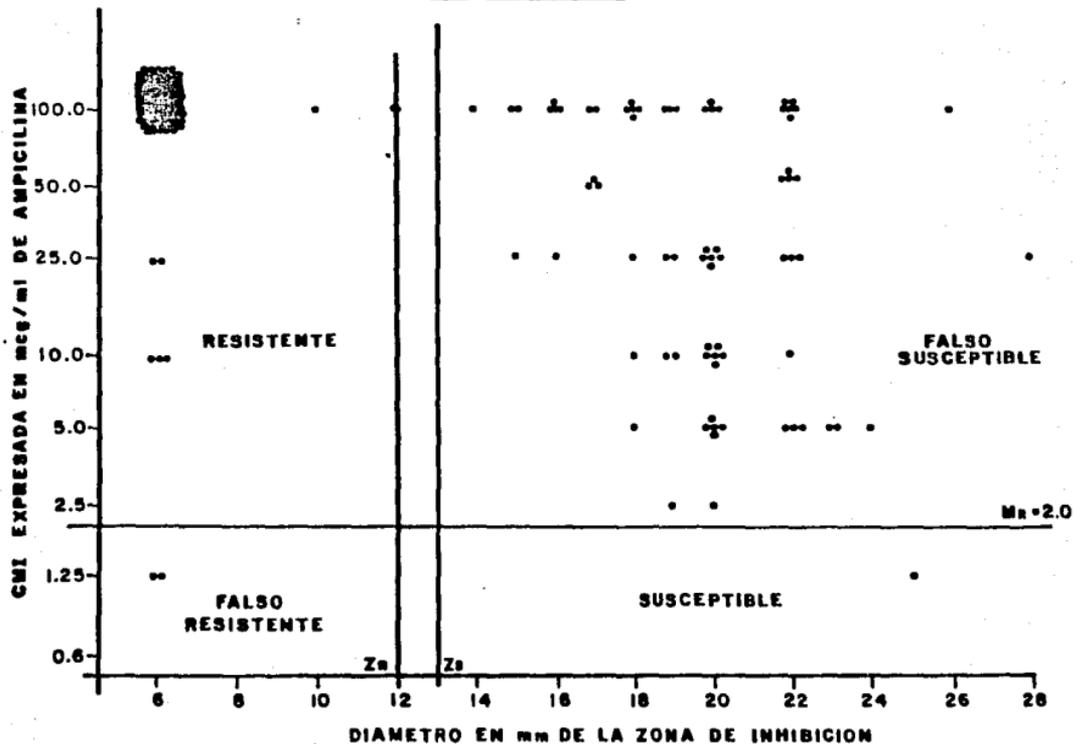
# DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE CMI DE GENTAMICINA SEGUN PORCENTAJE ACUMULADO DE 200 CEPAS DE *Salmonella* spp



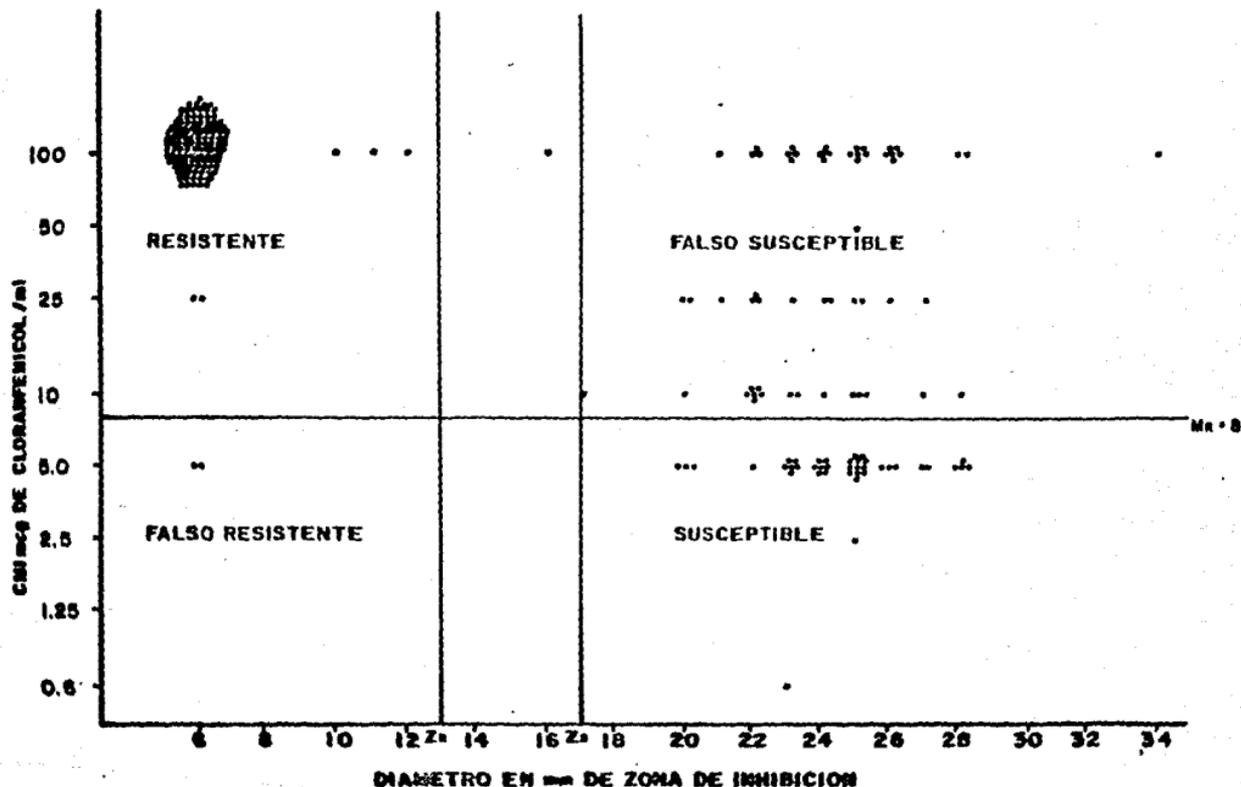
CORRELACION DE LOS VALORES CMI Y LAS ZONAS DE INHIBICION DE AMIKACINA EN 20 CEPAS DE Salmonella spp



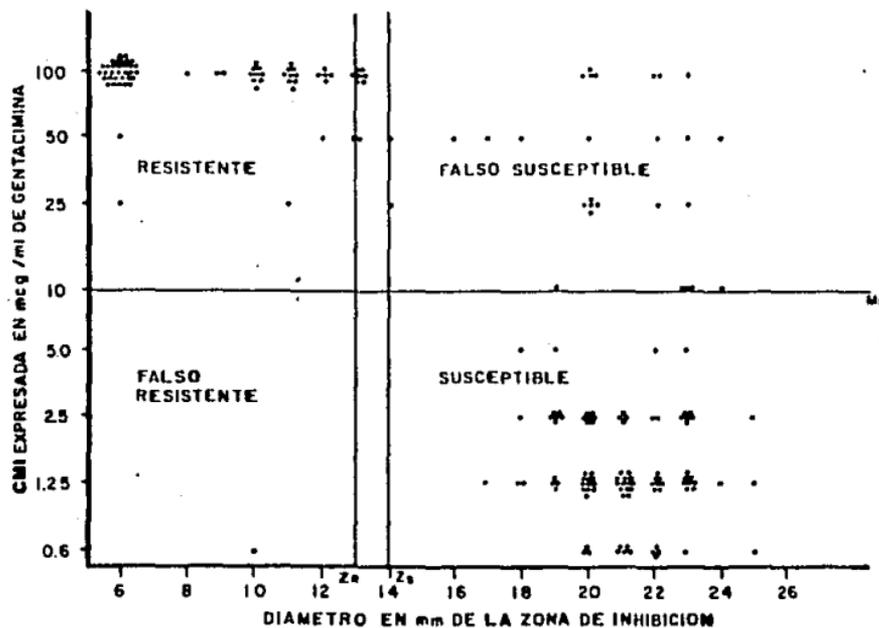
**CORRELACION DE LOS VALORES DE LA CMI Y LAS ZONAS DE INHIBICION DE AMPICILINA DE 200 CEPAS DE Salmonella spp.**



CORRELACION DE LOS VALORES DE CMI LAS ZONAS DE INHIBICION DE CLORANFENICOL EN 200 CEPAS DE Salmonella spp.



CORRELACION DE LOS VALORES DE LA CMI Y LAS ZONAS DE INHIBICION DE GENTAMICINA DE 200 CEPAS DE Salmonella spp



## DISCUSION

Los resultados obtenidos por la técnica de Kirby-Bauer mostraron en general un alto porcentaje de cepas resistentes a cloranfenicol y ampicilina, esto podría explicarse debido al origen de las cepas, ya que proceden de un medio hospitalario de una zona urbana, y como ya se ha demostrado, éstas muestran resistencia en un porcentaje mayor que las de origen rural o las de otras fuentes (22). Kupersztoch en 1981, encontró que había una elevada resistencia en cepas procedentes de hospitales en relación a cepas procedentes de laboratorios privados (23). Vázquez mostró en cepas de origen hospitalario, que la resistencia era elevada para varios antibióticos y variaba según el año considerado (24). El elevado número de cepas resistentes frente a cloranfenicol y ampicilina podría hacer pensar que se trata de clones que tienen la misma resistencia, pero parece que no es el caso, ya que al considerar los otros antibióticos, los porcentajes de resistencia son diferentes, a pesar de que éstos fueron semejantes para cloranfenicol y ampicilina; no se puede involucrar una resistencia cruzada ya que estos antibióticos tienen diferentes mecanismos de acción, uno como inhibidor de la síntesis de pared celular y el otro como inhibidor de síntesis de proteínas que afectan a la subunidad ribosómica 50 S. La resistencia no se debe a la presencia de una enzima o enzimas comunes que destruyeran a estos antibióticos ya que se sabe que en el caso de ampicilina la bacteria sintetiza una beta-lactamasa y en el del cloranfenicol una acetiltransferasa (25). Podría pensarse igualmente que se deba

a la presencia de un plásmido común con información para la resistencia a estos dos antibióticos, además de para otros. También pudiera explicarse por medio de los siguientes mecanismos:

- a) por alteraciones de la permeabilidad, aunque se han descrito para beta-lactamasas y tetraciclinas, pero no para otros antibióticos (26).
- b) por modificación de las macromoléculas que son esenciales para la vida de las bacterias, sobre las que actúan los antibióticos (26).
- c) modificación de la cantidad de un metabolito esencial (25).

La resistencia a gentamicina fue semejante a la reportada por otros autores, y se cree que se debe a la presencia de enzimas sintetizadas según información del cromosoma o de plásmidos que además puedan llevar o no información para cloranfenicol y ampicilina, por lo que en estas cepas podrían encontrarse plásmidos con información para resistencia a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina y ampicilina o cloranfenicol solamente, esto no se investigó en este proyecto (24,26).

Al comparar gráficamente las dos técnicas de sensibilidad utilizando el método sugerido por Metzler y De Haan que emplea el cálculo de la línea de regresión, se observó incongruencia para los cuatro antibióticos entre los datos proporcionados por un método y otro (21). Estas incongruencias sin embargo, no son únicas en la literatura revisada, ya que las mencionan entre otros, Degener y

col que las justifican en base a diferencias en los criterios establecidos por el grupo holandés y por el Comité Nacional de los Valores Estándar para Laboratorios Clínicos para determinar cuáles cepas son sensibles y cuáles resistentes (27). En este trabajo, las mayores incongruencias fueron las obtenidas para amikacina y ampicilina y las menores para cloranfenicol y gentamicina. Estas diferencias encontradas entre el número de cepas sensibles por el método de disco, pero resistentes por CMI en agar, no pueden explicarse por haberse ajustado a los factores que han sido establecidos por Barry y que son:

- a. Composición del medio de cultivo, ya que se usó agar Mueller-Hinton en todos los experimentos.
- b. Temperatura de incubación, que en ambos métodos fue de 37° C.
- c. Tiempo de aplicación del disco (Kirby-Bauer), éste no fue mayor de 3 minutos.
- d. Profundidad del agar, se empleó siempre la misma cantidad del medio de cultivo en todos los experimentos, la irregularidad del fondo de las cajas de Petri empleadas que podría ser un factor importante, se eliminó por el grosor del agar empleado, que evitó que la difusión del antibiótico no fuera lateral y por tanto no hubiera variaciones en los halos de inhibición (3).

Se ha reportado que la resistencia múltiple puede presentarse en un microorganismo, mediada por información contenida en plásmidos

únicamente o en combinación con información cromosomal. Las enzimas que destruyen o modifican la acción de los antibióticos pueden ser, como ya se mencionó de origen plasmídico, otras cromosomales constitutivas y las cromosomales inducidas. El número de cepas que no correlacionaron empleando el método de Kirby-Bauer en comparación con el de CMI, se piensa que se deba posiblemente a una incapacidad de dicho método para poner de manifiesto las enzimas inducidas y que por el método de CMI sí se manifiestan; esta inducción puede depender, como ya se ha mencionado en la literatura, del medio de cultivo, de la longitud y duración de la inducción, de la concentración del inductor y de la estabilidad del inductor de la enzima; estas enzimas pueden estar presentes en algunas bacterias y en otras no (28).

Las diferencias observadas, en relación al número de falsos sensibles obtenidos por el método de disco cuando se comparan con los valores de la CMI, podrían deberse también a que el contenido de los sensidiscos tuviera mayor concentración de la señalada por el proveedor.

## CONCLUSIONES

1. Los dos métodos empleados indicaron falta de concordancia en lo que se refiere a amikacina, ampicilina y cloranfenicol.
2. Lo anterior podría deberse a fenómenos que no se han reportado o tratarse de cepas que tienen un comportamiento diferente aunque pertenezcan a un solo género, aunque en la técnica señalada por Metzler y De Haan emplearon cepas de diferentes géneros.
3. No se debe de ignorar este hallazgo, sino que deberían hacerse más correlaciones para el género Salmonella de diferentes orígenes, además de hacerlo con cepas pertenecientes a otros géneros.
4. Los resultados obtenidos con el método de disco deben interpretarse con cuidado, ya que se utiliza en muchos hospitales como base para la administración de fármacos en procesos infecciosos.
5. No debe olvidarse que la técnica de Kirby-Bauer determina los patrones de resistencia en hospitales y es muy útil, ya que permite conocer epidemiológicamente los patrones de resistencia predominantes comparando las distintas épocas del año y, de esta manera, alertar sobre la posible fuente de una infección hospitalaria, independientemente de que correlacione o no con los valores de CMI.

## RESUMEN

Se determinó la sensibilidad de 200 cepas de Salmonella spp de origen hospitalario por los métodos de Kirby-Bauer y CMI. Los antibióticos empleados fueron amikacina, ampicilina, cloranfenicol y gentamicina. Los resultados obtenidos se correlacionaron comparando los halos de inhibición con la CMI expresados en mcg. Estos mostraron que no hubo correlación para amikacina en el 65%, para ampicilina en el 51%, para cloranfenicol en el 28.5% y para gentamicina en el 13.5%; el método de disco proporcionó resultados que al compararlos con la CMI correspondieron a falsos sensibles, variando para cada antibiótico.

La falta de correlación no se considera se deba a defectos de la técnica, ya que se obtuvieron cepas que correlacionaron por los dos métodos, se propone que esta diferencia se deba a características especiales de las enzimas responsables de la resistencia que se manifiesten por el método de Kirby-Bauer y no por el de CMI.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cherubin Ch E, Eng R H K, Smith S M and Goldstein E J C. Cephalosporin therapy for Salmonellosis. Arch Intern Med 146:2149-2152, 1986.
2. Barry A L and Thornsberry C. Susceptibility test: Difussion test procedures. In "Manual of Clinical Microbiology". Ed by Lennette E H, Ballows A, Hausler W J and Shadomy H J. 4th Ed Amer Soc Microbiol. Washington D C pp 978-987, 1985.
3. Barry A L. Agar Diffusion. General Considerations. In "The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices". Lea and Febiger Philadelphia pp 163-178, 1976.
4. Garrod P L, Lambert H P and O'Grady F. Antibiotic and Chemotherapy. 4th Ed Churchill Livingstone, Edinburgh and London pp 1-274, 1973.
5. Murray B E, Alvarado T, Kim K H, et al. Increasing Resistance to Trimetropim-Sulfamethoxazole among isolates of Escherichia coli in developing countries. J Infec Dis 152:1107-1113, 1985.
6. Joklik W K and Willett S A. Agentes Antimicrobianos. En "Microbiología". 18a Ed Panamericana S.A. Argentina pp 234- 279, 1986.
7. Weinstein L. Quimioterapia de las Enfermedades Infecciosas. En "Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Editado por Goodman L S, Gilman A. 5a Ed Interamericana México pp 943-1046, 1978
8. Meyer R D. Diagnosis and Treatment. Drugs five years later. Amikacin. Ann Inter Med 95:328-332, 1981.
9. Kawaguchi H. Discovery. Chemistry and Activity of Amikacin. J Infect Dis 134(Supp):242-248, 1976.
10. Koneman E W, Allen S D, Dowell V R, y Sommers H M. Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos. En "Diagnóstico Microbiológico". 1a Ed Médica Panamericana Argentina pp 380-402, 1983.
11. Bondi A, Spaulding E H and Smith D E. A Routine Method for the Rapid Determination of Susceptibility to Penicillin and Others Antibiotics. Am J Med Sci 213:221-225, 1947.
12. Barry A L. Broth Dilution Techniques. In "The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices". Lea and Febiger Philadelphia pp 92-104, 1976.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

13. Barry A L. Agar Dilution Techniques. In "The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices". Lea and Febiger Philadelphia pp 76-83, 1976.
14. Jones R N, Barry A L, Gavan T L and Washington II J A. Susceptibility Test: Microdilution and Macrodilution Broth Procedures. In "Manual of Clinical Microbiology". Ed by Lennette E H, Ballows A, Hausler W J and Shadomy H J 4th Ed Amer Soc Microbiol Washington D C pp 972-977, 1985.
15. Washington II J A. Susceptibility Test: Agar Dilution. In "Manual of Clinical Microbiology". Ed by Lennette E H, Ballows A, Hausler W J and Shadomy H J 4th Ed Amer Soc Microbiol Washington D C pp 967-971, 1985.
16. Steers E, Foltz E L and Graves B S. An Inocula Replicating Apparatus for Routine Testing of Bacterial Susceptibility to Antibiotics. Antibiot Chemother 9:307-311, 1959.
17. Edwards P R and Ewing W H. The Genus Salmonella. In "Identification of Enterobacteriaceae". Burgess Pub Co Minneapolis pp 181- 245, 1988.
18. Rubin R H and Weinstein L. Epidemiology of Disease Caused by Salmonella. In "Salmonellosis". Stratton Intercontinental Medical Book Co New York pp 13-24, 1977.
19. Barry A L. Establishment of Zone-Size Interpretive Criteria. In "The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices". Lea and Febiger Philadelphia pp 196-207, 1976.
20. Daniel W W. Biocestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud LIMUSA México pp 243-290, 1980.
21. Metzler C M and DeHaan R M. Susceptibility Test of Anaerobic Bacteria: Statistical and Clinical Considerations. J Infec Dis 30:588-594, 1974.
22. Sánchez H G. Comparación de la Resistencia a Varios Antimicrobianos de Cepas de Salmonella spp aisladas de dos Poblaciones una Hospitalaria y la otra Rural. Tesis Recepcional de Biología UNAM, ENEP Iztacala, 1989.
23. Kupersztuch Y M. Antibiotic Resistance of Gram Negative Bacteria in Mexico: Relationship to Drug Consumption. In "Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids". Ed by Levy S B, Clowes R C and Koening E L. Plenum Pub Co pp 529- 537, 1981.
24. Vázquez V. Resistencia de Salmonella no typhi a los antimicrobianos. En "Enfermedades Diarréicas e Hidratación Oral". 2do Seminario Taller Internacional Ed Avila Cisneros I UNICEF México pp 53-58, 1987.

25. Mitscher L A. Chemistry of Newer Antibiotics Directed Toward Overcoming Bacterial Resistance. Bull N Y Acad Med 63:269-294, 1987.
26. Neu H C. The Biochemical Basis of Antimicrobial and Bacterial resistance. Bull N Y Acad Med 63:295-317, 1987.
27. Degener J E, Thomas I P and Michel M F. The Antimicrobial Susceptibility Test; A Comparison of the Results of Four Methods. J Appl Bacteriol 50:505-517, 1981.
28. Bush K. Recent Developments in Beta-Lactamase Research and their Implications for the Future. Rev Infect Dis 10: 681-690, 1988.

APENDICE

PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

1. AGAR MAC CONKEY (Merck 5465)

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| - Composición            | g/ml  |
| peptona de caseína       | 17.0  |
| peptona de carne         | 3.0   |
| lactosa                  | 10.0  |
| mezcla de sales biliares | 1.5   |
| cloruro de sodio         | 5.0   |
| rojo neutro              | 0.03  |
| crystal violeta          | 0.001 |
| agar-agar                | 13.5  |

- pH final        7.1 ± 0.1

- Preparación:

Suspender 50 g en 1000 ml de agua destilada, dejar remojar 15 min y hervir con agitación continua hasta completa disolución.

Esterilizar en autoclave (15 min a 121° C). El medio es vaciado en cajas Petri permitiendo que se forme una capa gruesa. Las cajas deben de dejarse secar antes de usarse.

2. AGAR MUELLER-HINTON (Merck 5437)

|                     |      |
|---------------------|------|
| - Composición g/ml  |      |
| infusión de carne   | 2.0  |
| caseína hidrolizada | 17.5 |
| almidón             | 1.5  |

agar-agar 12.5

- pH final 7.4 ± 0.2

- Preparación:

Suspender 36.5 g en 1000 ml de agua destilada, se deja remojar, se calienta hasta su completa disolución. Una vez disuelto se reparte 45 ml en cada matraz Erlenmeyer para la prueba de Kirby-Bauer y 13 ml en tubos de 16 x 150 para la CMI. Se esteriliza en autoclave.

### 3. CALDO TRIPTICASA DE SOYA (Bioxon 111-1)

- Composición g/ml

peptona de caseína 17.0

peptona de soya 3.0

cloruro de sodio 5.0

fosfato dipotásico 2.5

glucosa 2.5

- pH final 7.3 ± 0.1

- Preparación

Suspender 30 g en 1000 ml de agua destilada. Disolver completamente y se distribuye en tubos de 13 x 100 y se esteriliza en autoclave 15 min a 121° C

## PREPARACION DE REACTIVOS

### 1. SOLUCION DE AMIKACINA (Donado por la Cía Bristol)

Se utilizó una sal de amikacina pura con una potencia de 905 mcg/mg, se hicieron los siguientes cálculos para tenerla a una concentración de 1000 mcg/ml.

$$\underline{100 \text{ ml} \times 1000 \text{ mcg/ml}} = 110.5 \text{ mg}$$

$$905 \text{ mcg/mg}$$

Se pesa la cantidad indicada y se disuelve con el amortiguador de fosfatos pH=8 en un matraz aforado y se afora con agua destilada.

2. SOLUCION DE AMPICILINA (Donada por la Cía Bristol)

Se usó una sal de ampicilina pura con una potencia de 886 mcg/mg, los cálculos siguientes se realizaron para tener la solución a una concentración de 1000 mcg/ml.

$$\underline{100 \text{ ml} \times 1000 \text{ mcg/ml}} = 112.86 \text{ mg}$$

$$886 \text{ mcg/mg}$$

Se pesa la cantidad indicada y se disuelve en amortiguador de fosfatos de pH=8 y se afora hasta la marca con el amortiguador de fosfatos de pH=6.

3. SOLUCION DE CLORANFENICOL (Donada por la Cía Bristol)

Esta sal viene con una potencia de 1000 mcg/mg, por lo cual no fue necesario ajustar su potencia para tenerla a una solución de determinada concentración. Se pesa la cantidad deseada, se disuelve en etanol y se afora hasta la marca con agua destilada.

4. SOLUCION DE GENTAMICINA (Donada por la Cía SCHERAMEX)

Esta solución se prepara con una sal de gentamicina pura con una potencia de 601 mcg/mg, se realizan los siguientes cálculos para tener la solución a una concentración de 1000 mcg/ml:

$$100 \text{ ml} \times 1000 \text{ mcg/ml} = 166.38 \text{ mg}$$

$$601 \text{ mcg/mg}$$

Se pesa la cantidad deseada y se disuelve en el amortiguador de fosfatos con pH=8, se coloca en una matraz aforado y se lleva hasta la marca de afora con agua destilada.

5. SOLUCION DE CLORURO DE BARIO AL 1 % (Técnica Química C1320)

Se pesa 1 g de cloruro de bario y se disuelve en 100 ml de agua destilada para tener la solución al 1 %.

6. ACIDO SULFURICO AL 1 % (Merck 1/15851)

Se mide con cuidado 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se diluye con 100 ml de agua destilada, para tener la solución al 1 %.

7. SOLUCION DE CLORURO DE SODIO AL 0.85% (Técnica Química C1540)

Se pesa cloruro de sodio 0.85 g y se disuelve en agua destilada 100 ml para tener la concentración deseada.

8. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH=6

Se pesa 1.8 g de fosfato de potasio y 8.2 g de fosfato dipotásico, se disuelve en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH mediante potenciómetro. Esterilizar en autoclave a 15 lbs por 15 min a 121' C.

9. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH=8

Pesar 0.75 g de fosfato de potasio y 16.4 g de fosfato dipotásico, disolver en 1000 ml de agua destilada. Ajustar pH. Esterilizar.