



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINERGISMO ANTIMICROBIANO "IN VITRO" DE
CEPAS DE SALMONELLA TYPHI RESISTENTES A
CLORAMFENICOL

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARTHA GARCIA PEREZ

EXAMENES
PROFESIONALES

MEXICO, D. F.

1973.

1123



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE: OSCAR AMOR DODERO
SECRETARIO: ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
VOCAL : RAMON GUEVARA ESTRADA
1er SUPLENTE: LEONOR MARTINEZ SOTO
2do SUPLENTE: ELDA PENICHE QUINTANA

Sitio donde se desarrollo el tema:

HOSPITAL DEL NIÑO IMAN

Nombre completo del sustentante:

MARTHA GARCIA PEREZ

Nombre completo del asesor del tema:

OSCAR AMOR DODERO.

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE

CON CARÍÑO A MIS HERMANOS

A la Dra. Virginia Vásquez A. por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

Con agradecimiento a los Sres. Profesores por su apoyo y dirección en el desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que con su ayuda desinteresada colaboraron de alguna forma a la terminación de este trabajo.

AGRADEZCO AL HOSPITAL DEL NIÑO
DE LA INSTITUCION MEXICANA DE
ASISTENCIA A LA NIÑEZ POR LAS
FACILIDADES QUE ME BRINDO A TRA
VES DEL LABORATORIO DE BACTERIO
LOGIA PARA HACER POSIBLE LA REA
LIZACION DE ESTE TRABAJO.

INDICE

	P á g i n a
CONTENIDO	
CAPITULO I	
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	5
CAPITULO II	
MATERIAL Y METODOS	24
CAPITULO III	
RESULTADOS	36
CAPITULO IV	
DISCUSION	64
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	72

CONTENIDO

CONTENIDO

I.- Se establecen los objetivos y fines de este estudio.

II.- Se hace una breve revisión acerca de: Antimicrobianos; Pruebas de Sensibilidad y Primeros estudios de Combinaciones de Antimicrobianos.

III.- Se describe la metodología seguida para el desarrollo de este trabajo, tratando de dar los detalles más importantes, de los tres métodos utilizados, siendo éstos en la actualidad los que con mayor frecuencia se emplean, dando los resultados de mayor confiabilidad.

IV.- En el capítulo correspondiente a los resultados obtenidos en este trabajo, se muestran gráficamente y en forma objetiva.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Durante la epidemia de Fiebre Tifoidea del - año de 1972, ocurrida en la Ciudad de México y lugares - vecinos se observó un hecho muy importante que fue:

Los gérmenes patógenos causantes de esta epidemia, *Salmonella typhi*, presentaron una característica, que modificó y revolucionó la terapia de Fiebre Tifoidea, esta fue que al determinar su sensibilidad a la acción - de los antimicrobianos mostraron ser Resistentes a la acción de Cloramfenicol.

Los reportes y la práctica, hasta antes de la aparición de esta epidemia reportaban, que las cepas de *Salmonella typhi* eran Sensibles a este antibiótico, era el más utilizado y más eficaz para la curación de dicha enfermedad.

Las cepas fueron aisladas, de diversos productos patológicos tales como Coprocultivos, Mielocultivos, Hemocultivos y Biopsias hepáticas. Otra característica - reunida por estas cepas fue que presentaron una variedad de antígeno virulento llamado Antígeno Vi.

El presente trabajo, se realizó principalmente con un fin clínico, ya que era necesario encontrar - una solución pronta a problemas tales como:

a) La resistencia mostrada por las cepas, que trajo como consecuencia un incremento muy alto en morta-

lidad sobre todo en niños.

b) La elección del antimicrobiano adecuado, - que en baja concentración ocupara el lugar de Cloramfenicol, ya que el uso de éste, no era adecuado.

c) Si el estudio "in vitro", de combinación - de antimicrobianos, era adecuado, y si dichas combinaciones podían ser más efectivas, que la aplicación y uso de los antimicrobianos en forma independiente.

A la combinación de antimicrobianos se le da el nombre de SINERGISMO.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

Antibiótico.— Tiene un origen microbiano generalmente.

Agente Quimioterápico.— Es un producto obtenido, de síntesis orgánicas.

Uwilleman en 1889, fue el primero en utilizar la palabra antibiótico, la cual denota antagonismo entre cultivos microbianos vivos.

Los microorganismos cuando encuentran el medio ambiente desfavorable, ponen de manifiesto mecanismos de defensa que les permita su supervivencia. Los cambios en el medio ambiente pueden ser debidos a la presencia de otros gérmenes, en el mismo medio o bien modificaciones de tipo físico tales como: pH, tensión superficial, temperatura, cantidad de nutrientes, etc.

Estos mecanismos de defensa, se manifiestan por la producción de sustancias a veces tóxicas para el medio ambiente que permiten el desarrollo adecuado de los microorganismos inhibiendo o neutralizando estos factores adversos.

Cuando los gérmenes producen sustancias, que inhiben o impiden el desarrollo de otros, se dice que tienen o poseen un fenómeno que recibe el nombre de Antibiosis, refiriéndose éste a la producción de Antibióticos.

Antibiótico: Sustancia específica que altera el metabolismo de un germen, hasta el punto de que éste muera o sea incapaz de reproducirse.

Se pueden definir tres etapas en la Historia, Investigación y Producción de Antimicrobianos.

La primera etapa tuvo como características, el conocimiento de un gran número de sustancias, de origen vegetal con propiedades curativas en infecciones sistémicas. Esta primera etapa se inició con el conocimiento de la Quinina, alcaloide de la Ipecacuana, ésta era y es utilizada para curar la Malaria desde el siglo XVII por los indígenas peruanos.

En estudios posteriores se conocieron otras sustancias con propiedades semejantes.

En 1877, Pasteur observó el hecho de que microorganismos saprófitos del aire podían detener o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos siendo éstos descritos por él. Pelletier y Caventu aislaron en 1820, la quinina de la Ipecacuana, así como otros alcaloides, en esta época se aislaron algunos antibióticos, iniciándose así el principio de la era que ha hecho un gran aporte para combatir un gran número de enfermedades.

Trabajos checoslovacos llevados a cabo por Hradl y Eukovky en 1899, nos hablan del conocimiento so-

bre el uso de un extracto de *Pseudomonas aureoginosa* - con aplicación local en infecciones.

Años más tarde, Fleming en 1923 observó, que en una placa sobre la cual había crecido un cultivo de *Micrococcus pyogenes* estaba presente un moho contaminante que producía un pigmento de color verde que impedía - el desarrollo bacteriano hasta cierta distancia en torno suyo.

Fleming estudió este modo y estos estudios - lo condujeron a la conclusión de que este pertenecía al género *Penicillium*, clasificándolo como *P. notatum* por lo que al pigmento producido se le dió el nombre de PENICILINA.

En 1939 Dubos, descubrió una substancia de - origen microbiano, que actuaba contra microorganismos - gram positivos y gram negativos por lo que se le dió - el nombre de GRAMICIDINA; este antibiótico es producido por un bacilo gram positivo llamado *Bacillus brevis*.

El apogeo en las investigaciones y uso de anti-
tibióticos, ocurrió en 1940, destacándose en su uso la -
Penicilina la cual incluso ha tenido en ocasiones un uso
inadecuado e incontrolable.

La segunda etapa en el avance y progreso de -
la terapéutica antimicrobiana, se refiere a la Síntesis
de Productos Químicos o sea lo que se conoce con el nom-

bre de Quimioterapia. El progreso de esta ciencia fue - casi en su totalidad de origen germano. Paul Erlich, al que se considera padre de la Quimioterapia, introdujo al campo de la Histología el uso de los colorantes; esta introducción trajo como consecuencia su empleo para curar infecciones producidas por Treponemas y Tripanosomas; a Erlich se debe el nombre y concepto de Quimioterapia.

Heibelberg y Jacobs en 1919, demostraron que las azosulfonamidas tenían propiedades antimicrobianas. En 1932 la actividad de las sulfonamidas quedó probada por Domagk, ésta fue realizada tanto en estudios "in vivo" como "in vitro".

Durante los años treinta fueron sintetizados, un gran número de sulfonamidas, muchas de las cuales no tuvieron aplicación en la clínica ya que resultaron tener efectos nocivos. Durante la Segunda Guerra Mundial, los agentes quimioterápicos tuvieron una gran aplicación.

La tercer etapa, fue un retorno a los productos actuales, de bajo orden considerados desde el punto biológico, o sea productos de hongos, bacterias y actinomicetos. Con estos productos de origen microbiano se creó un nuevo tipo de industria, que recibe el nombre de "Fermentaciones", de aplicación Industrial y Farmacéutica.

Se ha tenido en gran incremento, en este tipo de industria, creando una serie variada de nuevos produc

tos tanto de tipo bacteriano, como micótico o neoplási—
cas y algunas de tipo viral.

Las propiedades de los antimicrobianos, usa—
dos en este trabajo, se describen más adelante, de acuer—
do con la integración de Feingold, Gale y otros, clasifi—
cándolos en los siguientes grupos:

a) ACCION ESPECIFICA SELECTIVA EN LA PARED CE—
LULAR BACTERIANA.— A este grupo pertenecen la Penicili—
na y sus derivados semisintéticos tales como:

AMOXICILINA
AMPICILINA
CEFALEXINA
CEFALOTINA

b) INTERFIERE LA SINTESIS DE PROTEINAS Y FUN—
CION RIBOSOMAL.— A este grupo también se le llama de los
Aminoglicósidos, debido a que en su estructura molecu—
lar esta presente una amina más un glucósido; pertenecen
a este grupo:

CLORAMFENICOL
ESTREPTOMICINA
GENTAMICINA
KANAMICINA
TETRACICLINA

MODO DE ACCIÓN.— Este modo de acción está re—
ferido también de acuerdo con la integración antes refe—

rida.

a) Penicilina y sus derivados semisintéticos.-

Como ya se dijo, actúan específicamente a nivel de la Pared Celular Bacteriana, interfieren la incorporación de aminoácidos esenciales para que se lleve a cabo dicha síntesis.

Esta inhibición se debe a la producción de una enzima que recibe el nombre de beta lactamasa, la reacción que se lleva a cabo es de tipo competitivo debido, a que, la formación del complejo enzima-inhibidor, compite con la formación del complejo enzima-sustrato. La similitud de estructuras del anillo beta lactámico de la penicilina con la estructura de la enzima beta lactamasa producida por los microorganismos, es la causante de que ocurra este fenómeno.

b) En este grupo, de los llamados aminoglicósidos, hay una inhibición en la síntesis de proteínas debido a una interferencia con la transferencia a los ribosomas de los aminoácidos activados al RNA de transferencia. La falta en el balance de proteínas y la síntesis de proteínas y la síntesis de RNA, conduce a un exceso del RNA mensajero y a un incremento de la proteína patrón del ribosoma.

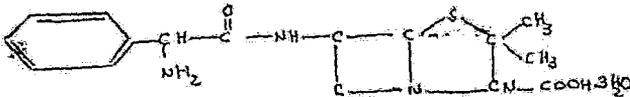
Este grupo de Antibióticos bloquea la unión del RNA mensajero a los ribosomas, por lo que al no llevarse a cabo esta unión no puede haber como es lógico la lectura para que se lleve a cabo la síntesis de pro-

teínas.

CARACTERISTICAS FISICAS-QUIMICAS-CLINICAS DE ANTIMICROBIANOS

Para dar estas se sigue con la clasificación mencionada anteriormente,

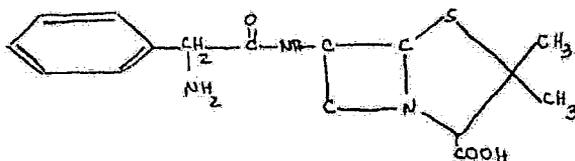
a) AMOXICILINA.- Acido 6(-) alfa-amino-p-hidroxifenil acetamido penicilánico.



La Amoxicilina fue elaborada y descubierta por los Laboratorios Beecham. Es un derivado del núcleo penicilánico es considerando un quimioterápico de amplio espectro (activo contra bacterias gram positivas y gram negativas), estable en medios ácidos se absorbe a nivel intestinal.

AMPICILINA.- Compuesto semisintético derivado del núcleo de la Penicilina, al igual que la Amoxicilina fue descubierto por los Laboratorios de Investigación Beecham.

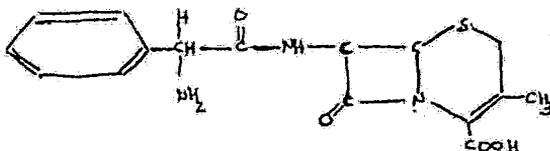
Nombre Químico.- Acido (alfa-amino-fenil-acetamido) Penicilánico.



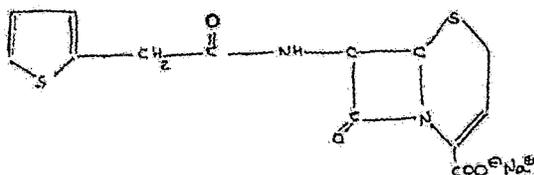
Agente quimioterápico de amplio espectro, resistente a la acción de los ácidos.

CEFALOSPORINAS.— A este grupo pertenecen, entre otras la Cefalexina y la Cefalotina; se hace referencia a éstas, ya que fueron las que se utilizaron en el presente trabajo. Son descritas por Florey en 1955 en Oxford, producidas por especies de *Cephalosporium*, tal hecho fue reportado por Abraham en 1960.

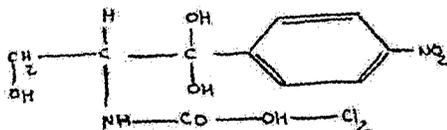
CEFALEXINA.— Su nombre químico es 7(-D-alfa-amino-fenil-acetamido)-3-metil-3-cefem-4 ácido carbonílico.



CEFALOTINA.— Es un derivado del 7(tiofeno-2-acetamido-) Acido Cefalosporánico. Antibiótico de amplio espectro.

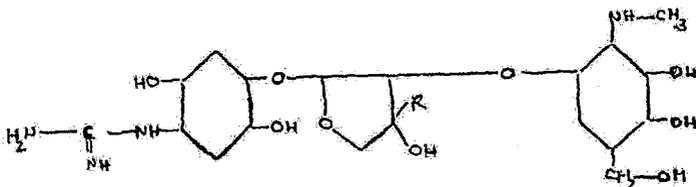


b) CLORAMPENICOL.— Fue el primer antibiótico de amplio espectro utilizado. Se aisló de *Streptomyces venezuelae* en 1947 por Erlich y colaboradores, su estructura química fue elucidada por los Laboratorios Parker Davies. Se sintetiza también a partir de nitro benzaldehído haciendo uso de complejos del ácido bórico. — Ya sea en forma natural o sintetizado, tiene las mismas propiedades físicas, químicas, antimicrobianas y terapéuticas.



Este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas tanto a nivel de células bacterianas como en células de mamíferos.

ESTREPTOMICINA.— Aislado de *Streptomyces griseus* en 1944, por Schatz, Bugie y Waksman. Las sales inorgánicas son las que se utilizan en la clínica, principalmente el sulfato.

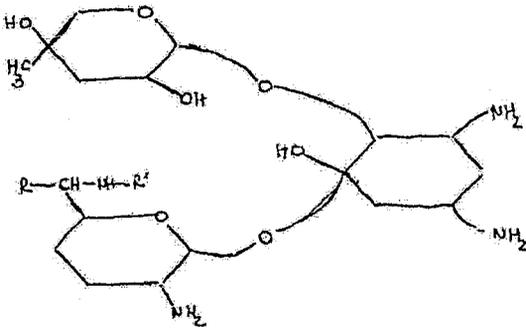


Su actividad antimicrobiana es muy grande en medio alcalino a un pH de 7.8, su actividad baja considerablemente en medio de un pH de 6.0 ó menos.

GENTAMICINA.— Es un antibiótico complejo, de amplio espectro, fue aislado de *Micromonospora purpurea* en 1963. Está formado por tres componentes designándose como:

$R=R' = CH_3$	Gentamicina C_1
$R=CH_3; R'=H$	Gentamicina C_2
$R=R'=H$	Gentamicina C_1A

Proponiéndose la siguiente fórmula estructural. Tiene una gran actividad antimicrobiana.



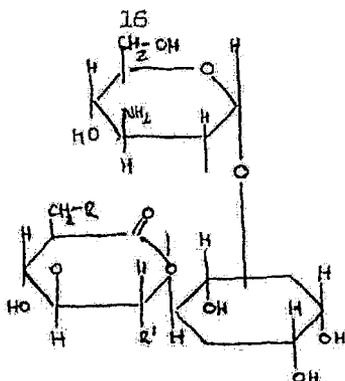
KANAMICINA.— Fue aislada en 1957, en Japón de especies raras de *Streptomyces kanamyceticus*, es soluble en agua tiene dos amino azucares conjugados con un glucósido, unidos a dos diccos de estreptamina. La kanamicina está constituida por tres componentes; se las designa como:

- | | |
|------------------------------|--------------|
| a) 6 amino-6-deoxi-D-glucosa | Kanamicina A |
| b) 3 amino-3-deoxi-D-glucosa | Kanamicina B |
| c) 2 deoxi-estreptamina | Kanamicina C |

En los cuales los radicales significan:

Kanamicina A	$R = \text{NH}_2$; $R' = \text{OH}$
Kanamicina B	$R = R' = \text{NH}_2$
Kanamicina C	$R = \text{OH}$; $R' = \text{NH}_2$

Antibiótico de amplio espectro; el sulfato — constituye el 97% de la droga útil.

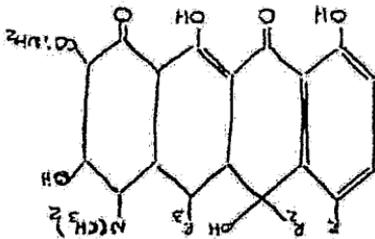


TETRACICLINA.— Este grupo está constituido:

	R_1	R_2	R_3
TETRACICLINA	H	CH_3	H
CLOROTETRACICLINA	Cl	CH_3	H
OXITETRACICLINA	H	CH_3	OH
DIMETIL-CLORO-TETRACICLINA	Cl	H	H

Estos cuatro antibióticos constituyen el grupo de las Tetraciclinas, varían según estén mencionados. La fórmula estructural es similar en los cuatro. Han sido aislados de varias especies de *Streptomyces*, tales como *S. aureofaciens*; *S. rimosus*. Son antibióticos de amplio espectro de color amarillo cristalinas, anfotéricas de baja solubilidad.

Los antimicrobianos anteriormente citados actúan sobre *Salmonella typhi*.



PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.- Cuando se tuvo el conocimiento de la existencia de sustancias con efectos curativos, su aplicación y uso para obtener efectos antagonistas a las sustancias tóxicas producidas por los gérmenes patógenos, obtuvimos como consecuencia un gran aporte a la clínica y terapéutica.

Se ha tenido un gran incremento en el desarrollo, producción, aplicación y uso de antibióticos y agentes quimioterápicos. Los microorganismos al tener y mantener un contacto constante con los antimicrobianos desarrollan y ponen de manifiesto sus capacidades de supervivencia creando resistencia a la acción de estas sustancias.

Dicha resistencia se manifiesta por la acción nula de dichos antimicrobianos aún a altas concentraciones. De estos microorganismos es difícil detectar su susceptibilidad cuando llegan a desarrollar grados de resistencia muy grandes. El conocimiento para determinar el comportamiento de un germen patógeno frente a un antimicrobiano, se hace por medio de las pruebas denominadas Pruebas de Sensibilidad.

Pruebas de Sensibilidad.- Determina la cantidad de antimicrobiano que sea capaz de inhibir o impedir el crecimiento de un germen patógeno "in vitro".

Los antimicrobianos deben usarse en dosis terapéuticas óptimas, por un período también óptimo, ya que un descuido o un uso inadecuado por la administra-

ción de estos provoca o induce mutaciones que pueden tener consecuencias fatales tales como las que se observaron durante la epidemia de Fiebre Tifoidea del año de 1972.

Existen muchas técnicas o variaciones en las llamadas pruebas de sensibilidad.

El método utilizado por Florey y Chain (1941-46) recibe el nombre de Método de los Discos de Oxford, éste es el primer informe que se tiene acerca de las pruebas de sensibilidad más tarde se continuó la investigación acerca de dichas pruebas y así tenemos las siguientes técnicas entre otras:

Método del agar recortado

Método de papel filtro

Método de Kirby-Bauer

Método de dilución en placa

Método de dilución en tubo

Con la aparición de tantas pruebas de sensibilidad, así como modificaciones de las mismas se obtuvieron resultados en los que se presentaban grandes diferencias, debido a ésto la Organización Mundial de la Salud tomó la resolución de formar una comisión para que hubiera una unificación en reportar los datos, así como la estandarización de métodos.

Las condiciones standard comprenden: Tamaño del inóculo, Medios de cultivo, Tiempo de Incubación etc.

En la actualidad, los métodos de sensibilidad más usados, que además dan resultados de mayor precisión son los siguientes:

Método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

Método de dilución en placa (Jackson-Finland)

Método de dilución en tubo (Sabath)

En este trabajo, se utilizaron estos tres métodos además de los llamados de Microtitulación tanto en placa como en tubo.

Sinergismo: Acción conjunta de dos drogas, - que a baja concentración de una de ellas puede acelerar la acción letal de la otra, bajando considerablemente el valor de su C.M.I. En 1952, Jawtz reporta este fenómeno. En el presente trabajo se hace hincapié en dichos estudios.

De los primeros datos que se obtuvieron en la primera parte de este trabajo se utilizaron las siguientes combinaciones para llevar a cabo la parte correspondiente a Sinergismo.

Ampicilina-Kanamicina

Amoxicilina-Gentamicina

Fueron éstas elegidas por varias razones y - fundamentos.

En 1959, Jadio hizo los primeros estudios de la combinación Ampicilina-Kanamicina, después de las in-

investigaciones realizadas llega a la conclusión de que, - existe una acción sinergista, cuando se añaden pequeñas cantidades de Ampicilina a Kanamicina, esta combinación es útil para Staphilococcus; su acción en bacilos gram - negativos fue considerablemente más baja en comparación a la acción contra coccus gram positivos.

No se encontró información específica de la - aplicación y uso de esta combinación para la curación de Fiebre Tifoidea causada por Salmonella typhi Vi.

La combinación Amoxicilia-Gentamicina, tam- - bién fue usada en este trabajo, no encontrando reportes anteriores a su uso y aplicación durante el período de - la Fiebre Tifoidea. Su ensayo fue motivado debido a - los resultados obtenidos en la determinación de la C.M.I. y la Concentración Bactericida, realizadas en las 45 cepas.

La práctica nos dice que sólo en casos de emer- gencia se justifica el uso de combinaciones de antimicrog- bianos; ya que puede presentarse el hecho de no conocer lo suficiente acerca de las características de los anti- bióticos y agentes quimioterápicos lo cual traería un - efecto contrario al Sinergismo o sea que se presenta el fenómeno denominado Antagonismo.

El reflejo de esta acción antagónica o contra- ria se manifiesta o refleja en los datos que se obtienen al determinar los valores de las C.M.I. que en vez de - disminuir, aumentan. La combinación en lugar de ser fa

vorable, puede ser contraria al efecto que se pretendía, provocando en muchas ocasiones que los gérmenes patógenos adquirieran resistencia a la acción de estos antimicrobianos, siendo que en algunos casos son sensibles a dicha acción, aplicados en forma individual. Para que una combinación de antimicrobianos se pueda considerar como Sinergista, es necesario que la C.M.I. determinada para cada germen baje en su valor por lo menos en cuatro concentraciones.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Hospital del Niño I.M.A.N.

Las cepas con las que se trabajó fueron aisladas en el Laboratorio de Bacteriología de dicho Hospital; tenían una procedencia de:

37 Hemocultivos y 8 Mielocultivos.

Estas cepas se aislaron en un período comprendido entre el 3 de julio y 10 de octubre del año de 1972. Una vez aisladas e identificadas bioquímicamente, se procedió a la tipificación serológica teniendo como característica la presencia de la variedad de un antígeno, al cual se le dá el nombre de Antígeno Vi.

A estas cepas se les determinó la susceptibilidad a la acción de los antimicrobianos, mediante el Método de Kirby-Bauer para lo cual se utilizó el siguiente material:

Discos de papel filtro (Sensidiscos)

Contenido	Concentración
Amoxicilina	30
Ampicilina	10
Cefalexina	30
Cefalotina	30
Cloramfenicol	30
Estreptomina	10

Gentamicina	10
Kanamicina	30
Tetraciclina	30

Cajas de Petri de 150 mm de diámetro, conteniendo 60 ml. de Agar Mueller Hinton. (A.M.H.)
 Calco Mueller Hinton (C.M.H.)
 Solución Salina estéril
 Tubos de 20x150 mm. con 5 ml. de C.M.H.
 Hisópos estériles
 Patrón de Cloruro de Bario y H_2SO_4 (Nefelómetro)
 Aplicador mecánico
 Guía para interpretar el tamaño del halo de inhibición.

METODO:

a) Preparación del inóculo.— Se inocula cada una de las cepas en 5 ml. de C.M.H.; incubando por tres horas a 37°C con el objeto de tener un cultivo en la — fase logarítmica de crecimiento, el desarrollo obtenido se normaliza comparando el cultivo con un patrón de Cloruro de Bario, el cual es preparado por adición de 0.5ml. de una solución de 0.48 M de $BaCl_2$ (11.7 g de $BaCl_2 \cdot 2 - H_2O \times 1t.$) a 99.5 ml. (V/V) de H_2SO_4 (0.25 N), este patrón puede ser remplazado mensualmente.

b) Inoculación de las Placas.— Con el cultivo ya normalizado se procede a inocular las placas para lo cual se hace uso de un hisópo estéril estriando de una — manera lo más uniformemente posible.

c) Secado de las placas y aplicación de los — sensibilizadores.— Una vez inoculadas las placas se procede a

un secado parcial, dejándolas ligeramente abiertas con - el objeto de que el germen probado penetre en la superfi - cie del agar, después de ésto se hace la aplicación de - los discos que puede hacerse con un aplicador mecánico o bien con pinzas estériles flameándolas después de cada - aplicación presionando con las pinzas para asegurar el - contacto del antimicrobiano y el germen patógeno, el - tiempo entre la inoculación y la aplicación de los sensi - discos no debe exceder de 15 min. ya que se puede ini - ciar el desarrollo microbiano.

d) Incubación e Interpretación.- Las placas - se incuban a 37°C por 18 horas, al cabo de las cuales se hace la lectura de las zonas de inhibición, en caso de - que sean sensibles a la acción de los antimicrobianos, - en caso contrario no se observan zonas claras. Las lec - turas obtenidas se comparan con la guía con lo que se ob - tendrá si este diámetro corresponde a un microorganismo sensible, intermedio o resistente frente al antimicrobia - no.

Los datos proporcionados por este método, nos manifestaron el grave problema terapéutico: el porcenta - je tan elevado que se obtuvo de cepas resistentes a la - acción de Cloramfenicol, que hasta antes de la epidemia era el antibiótico indicado para combatir la Fiebre Ti - foidea.

Estos datos dieron origen al desarrollo y los objetivos de este trabajo. Por lo que se utilizaron mé - todos más sensibles que nos permitieran detectar los gra - dos de sensibilidad de los gémenes probados. Para este

fin se utilizaron los siguientes métodos.

- a) Método de Dilución en Placa
- b) Método de Dilución en Tubo

El material requerido por ambos métodos es:

a) Soluciones concentradas de: Amoxicilina; - Ampicilina; Cefalexina etc. Las soluciones patrones se prepararon en proporción de 100 mg de cada una de las sa les puras en 100 ml de disolvente para dar una concentra ción de 1000 micro-gramos/ml.

b) Soluciones diluidas de los antimicrobianos .- De cada uno de los antimicrobianos se prepararon solu ciones seriadas:

	desde	micro-gramos/ml hasta
Amoxicilina	500	1.5
Ampicilina	500	0.75
Cefalexina	50	0.39
Cefalotina	50	0.39
Cloramfenicol	1000	1.5
Estreptomicina	1000	1.5
Gentamicina	500	0.09
Kanamicina	500	1.5
Tetraciclina	1000	1.5

Composición de Agar Mueller Hinton

Fórmula en gm/ml

Infusión de carne 300.00

Peptona purificada	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0

Este medio queda a un pH 7,4

C.M.H. tiene una fórmula igual a A.M.H. excepto agar.

Los antimicrobianos se disolvieron en:

buffer de fosfatos a un pH de 8

Amoxicilina

Ampicilina

Cefalexina

Cefalotina

Gentamicina

Cloramfenicol en 5 ml de etanol aforar con C.M.H.

Estreptomocina en agua

Kanamicina en 5 gotas de una solución saturada de bicarbonato de sodio, aforar con buffer de fosfatos a un pH de 6

Tetraciclina en 5 ml de HCl 0.01N, aforar con buffer de fosfatos a un pH de 6

2.- Tubos de 20x150 mm con 9 ml de A.M.H.

Tubos de 20x150 mm con 5 ml de C.M.H.

Tubos de 20x150 mm con 4.95 ml de C.M.H.

Matraces de 25 ml de 19.8 ml de C.M.H.

Cajas de Petri con 9 ml de A.M.H.

Cajas de Petri con 9 ml de Gelosa Sangre Humana

Tubos de 13x100 mm estériles

Hisopos estériles

Pipetas de 1.5 y 10 ml. estériles

Lámpara

3.- 45 Cepas de Salmonella typhi Vi

METODOLOGIA.A) DILUCION EN PLACA

Preparación del Inóculo.- Se inocula un tubo conteniendo 5 ml de C.M.H., se incuba a 37°C, el cultivo debe ser de un período de desarrollo entre 18 a 24 horas.

Dilución de la Cepa.- Una vez que termina el tiempo de incubación se transfieren de este cultivo 0.05 ml a un tubo conteniendo 4,95 ml de C.M.H. teniendo de esta forma una dilución 1:10 de la cepa se incuba nuevamente por tres horas más; a 37°C.

Preparación de las Placas.- Unas cuantas horas antes de montar el experimento, se preparan las placas para lo cual se usarón los tubos que contenían 9 ml de A.M.H., estos se funden y se mantienen en Baño María a 50°C. A estos tubos se les agregó un ml. de las soluciones diluidas, de cada uno de los antimicrobianos, mezclando perfectamente, se vierten inmediatamente a las cajas de Petri estériles (cada uno de los tubos lleva una dilución diferente de los antimicrobianos), correspondiendo cada uno y cada dilución a una caja diferente.

Una vez que ha solidificado el medio, se procede a cuadrricular las cajas por la parte posterior, numerando los cuadros resultantes. Para las 45 cepas se utilizaron 2 cajas por cada una de las diluciones, en una de las cajas se pusieron 23 cepas y en la otra las 22 restantes.

Inoculación e Incubación.— En cada uno de los cuadros se inoculó una cepa diferente, esto se hizo con hisopo estéril impregnando el algodón del cultivo de tres horas, quitando el exceso del mismo oprimiendo el algodón en las paredes del tubo, de tal modo que el algodón quede humedecido con el cultivo; una vez termina da la inoculación de todas las cepas; las cajas inoculadas se incuban a 37°C por 18 ó 24 horas.

Lectura e Interpretación.— Al cabo del tiempo de incubación se leen las cajas dando los datos correspondientes a: C.M.I. y C. Bactericida.

Concentración Mínima Inhibitoria.— C.M.I. se refiere a aquella concentración mínima de antimicrobiano que inhibe o impide el desarrollo microbiano, es decir frena su desarrollo, pero no lo mata si no actúa en una forma estática.

Concentración Bactericida.— En esta definición está involucrado el concepto de matar a los microorganismos, queda definida como aquella concentración que tiene acción letal sobre los microorganismos.

En algunas ocasiones pueden coincidir en valor numérico ambas, pero generalmente el valor de la Concentración Bactericida es mayor a la C.M.I.

B) DILUCION EN TUBO

Preparación del Inóculo.— La preparación de —

éste es de la misma manera que la utilizada por el método de dilución en placa, lo único que varía es el tiempo de incubación, para este método se requiere un cultivo de una noche, cada ml. de este cultivo resultante contiene 10^9 microorganismos, se hacen diluciones de las cepas ya que para este método es necesario tener 10^4 microorganismos/ml.

Esto se obtiene, tomando del cultivo de una noche 0.05ml. añadiéndolo a 4.95 ml de C.M.H. de esta forma se tiene una dilución de 1x100, las cepas diluidas se incuban por un período de 3 horas a 37°C, al cabo de este tiempo, se toma 0.2 ml de este cultivo y se añade a 19.8 ml de C.M.H. teniendo como resultado una dilución de 1x10,000 de la cepa original.

Dilución de los antimicrobianos.— A partir de las soluciones patrón de los antimicrobianos se prepararon diluciones seriadas de las soluciones de éstos. En una gradilla se pusieron de 9 a 11 tubos de 13x100 mm. — estériles, esta variación se debió o fue consecuencia de los datos obtenidos en el método de dilución en placa.

Llenado de los tubos e Inoculación.— De cada una de las diluciones de los antimicrobianos se toma 0.5 ml. y se coloca en cada uno de los tubos estériles. Se inoculan éstos con las cepas previamente diluidas, — tomando de éstas un volumen de 0.5 ml; teniendo finalmente un volumen de 1 ml.

Incubación y Lectura.— Los tubos inoculados — se agitan e incuban a 37°C por 18 horas, una vez concluído este tiempo, se procede a su lectura. Para hacer — esta se examinan a contraluz con ayuda de una lámpara, — para observar un desarrollo visible por la turbidez que presenten.

Interpretación.— La concentración mínima inhibitoria está dada por aquella dilución anterior a la que se preserte un desarrollo visible; la Concentración Bactericida queda determinada por la resiembra en cuadros — de gelosa sangre humana, remembrando 4 diluciones anteriores donde se presentó el desarrollo visible, sembrando incluso ésta.

Microtitulación.— Existen dos variedades de — ésta, en placa y en tubo, su metodología se lleva a cabo como adelante se indica. Se lleva a cabo para conocer — el grado de Sensibilidad o Resistencia de los microorganismos a la acción conjunta de dos antimicrobianos. A — estas técnicas se les dá también el nombre de "Tablero — de Ajedrez", ya que se combinan los dos antimicrobianos en concentraciones diferentes, ésto se hace con el fin — de hacer una titulación en ambos antimicrobianos, dando de esta forma una información completa para tener conocimiento de efectos Sinergistas.

METODOLOGIA.

A) MICROTITULACION EN PLACA.

Preparación del Inóculo.— Este se prepara en

la misma forma, que la descrita en el método de dilución en placa.

Preparación de las Placas.— Para este fin se utilizaron las combinaciones: Ampicilina-Kanamicina y — Amoxicilina-Gentamicina. Teniendo como base los datos — proporcionados por el Método de Dilución en Placa, y — para dar un margen de mayor seguridad se usaron diluciones en concentraciones mayores y menores a las anteriormente empleadas.

Se colocan en una gradilla tubos estériles, — los cuales contendrán las soluciones diluidas de los antimicrobianos combinados lográndose esto poniendo volumen a volumen de cada uno de los antimicrobianos, de estas combinaciones se toma un ml. el cual se mezcla con 9 ml. de A.M.H.; fundido y conservado a B.M. a 50°C, vir tiéndose inmediatamente en cajas de Petri estériles, una vez solidificadas, se procede a la inoculación de las ce pas.

Inoculación e Incubación.— La inoculación se lleva a cabo de la misma forma que en el Método de Dilución en Placa, incubando a 37°C de 18 a 24 horas.

Lectura e Interpretación.— Los datos que nos proporcionan son los correspondientes a C.M.I. y C. Bactericida. Lo importante de este método es la información a nivel de combinaciones y concentraciones que nos indiquen si hubo efectos sinergistas o por el contrario, antagonistas. (Tabla No.)

MICROTITULACION EN TUBO.

Preparación del Inóculo.- Este se prepara de la misma forma que la utilizada en el Método de Dilución en Tubo; ya que las cepas se necesitan en la misma dilución que la empleada para el Método de Dilución en Tubo.

Preparación de los Tubos.- Se prepara una serie de tubos, en forma semejante a la utilizada en el Método de Microtitulación en Placa. El volumen empleado de cada una de las soluciones diluidas de los antimicrobianos es de 0.25 ml, para obtener un volumen final de 0.5 ml., éstos se ponen en tubos estériles de 13x100 mm., se agitan para mezclarlos.

Inoculación.- A cada una de las diluciones, se les inocula con 0.5 ml. de la cepa diluida como en el Método anteriormente citado, agitando nuevamente.

Lectura e Interpretación.- La forma de leer e interpretar los resultados es similar a la empleada en el Método de Dilución en Tubo. De acuerdo con la información final se puede ver, si, las combinaciones que se llevaron a cabo tienen efectos Sinergistas o Antagonistas.

Para el Método de Microtitulación en Placa se emplearon las 45 cepas; después de una elección o muestreo estadístico, se seleccionaron 10 cepas en las que se llevó a cabo la microtitulación en tubo.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados iniciales de este trabajo fueron proporcionados por el Método de Difusión en Placa - (Kirby-Bauer). El número de cepas de *Salmonella typhi* - Vi, con las que se llevó a cabo este trabajo fue de 45.

TABLA I

Antimicrobia no $\mu\text{g/ml}$.	C E P A S			
	SENSIBLES	INTERME MEDIAS	RESISTEN TENTES	TOTAL
AMOXICILINA 30	45	0	0	45
AMPICILINA 10	43	0	2	45
CEFALEXINA 30	45	0	0	45
CEFALOTINA 30	45	0	0	45
CLORAMFENICOL 30	5	0	40	45
ESTREPTOMICINA 10	0	0	45	45
GENTAMICINA 10	45	0	0	45
KANAMICINA 30	43	0	2	45
TETRACICLINA 30	1	0	44	45

Cl = Cloramfenicol AX = Amoxicilina
 CT = Cefalotina AM = Ampicilina
 CX = Cefalexina GE = Gentamicina
 KA = Kanamicina

Para preciar los grados hasta los cuales se alcanzaba la Resistencia al Cloramfenicol desarrollada por las cepas de Salmonella typhi Vi, se emplearon métodos más sensibles, tales como:

Método de Dilución en Placa y Método de Dilución en Tubo.

Ambos métodos se aplicaron utilizando los nueve antimicrobianos anteriormente mencionados, a las 45 cepas en estudio. Los datos obtenidos se agruparon en grupos de clases y frecuencias con el fin de obtener una media geométrica, para mostrar en forma global los resultados.

La fórmula utilizada para este fin es:

$$m = \text{antig} \frac{(f1)}{n}$$

m = media geométrica

f = frecuencia

l = logaritmo de los valores de las concentraciones de los antimicrobianos.

n = número total de cepas estudiadas.

Datos del Método de Dilución en Placa (Amoxicilina)

Ejemplo: f con log de con. f1

40	3.1	0.4914	0.4914.40=19.7560
2	1.5	0.1761	0.1761. 2= 0.3522
1	0.78	0.0891	0.0891. 1= 0.0891

$$2 \cdot 6.26 \cdot 0.7959 \cdot 0.7959 \cdot 2 = 1.5918$$

$$\frac{20.3791}{45} = 0.452$$

45

Antig 0,452 = 2.831

C.Bactericida : 2.831

De forma similar se agruparon los datos obtenidos de la aplicación de los 9 antimicrobianos con los dos métodos, aplicados a las 45 cepas, los resultados, - en forma resumida, son los siguientes:

TABLA II
MÉTODOS DE DILUCION

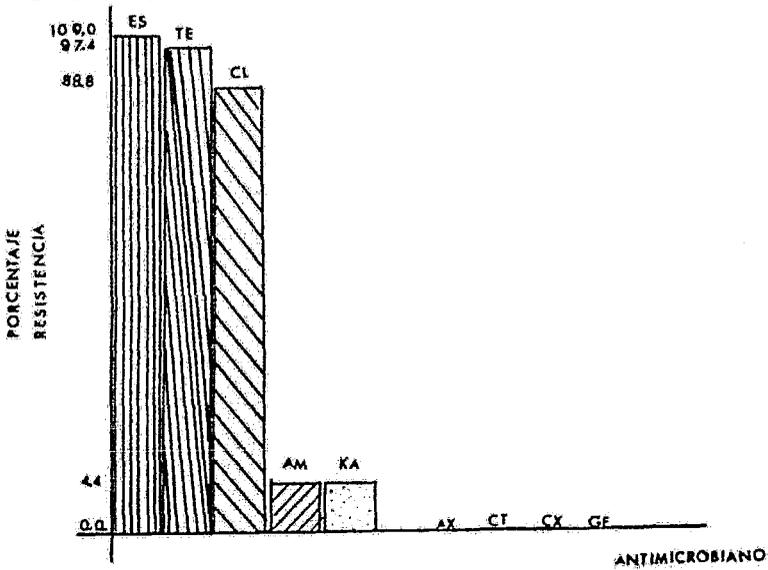
ANTIMICROBIANO	C.BACTERICIDA		C.M.I.	
	Placa	Tubo	Placa	Tubo
CLORAMFENICOL	810.3	205.5	405.1	241.6
ESTREPTOMICINA	583.4	143.2	291.7	94.9
TETRACICLINA	439.5	659.2	219.6	143.2
CEFALOTINA	50.7	9.5	25.3	8.3
CEFALEXINA	49.5	14.3	24.8	4.4
KANAMICINA	15.5	1.4	7.7	1.3
AMOXICILINA	2.8	1.2	1.4	0.9
AMPICILINA	1.6	1.2	0.8	1.6
GENTAMICINA	0.1	0.1	0.05	0.1

De acuerdo con los datos de la Tabla I, se hicieron los porcentajes para mostrar de una forma gráfica la incidencia en la Resistencia mostrada por estas cepas, a los antimicrobianos usados en este trabajo. Esta gráfica (No 1), en forma inversa se lee la Sensibilidad.

Porcentaje de Resistencia

(Método de Difusión en Placa Kirby-Bauer)

(Gráfica No.1)

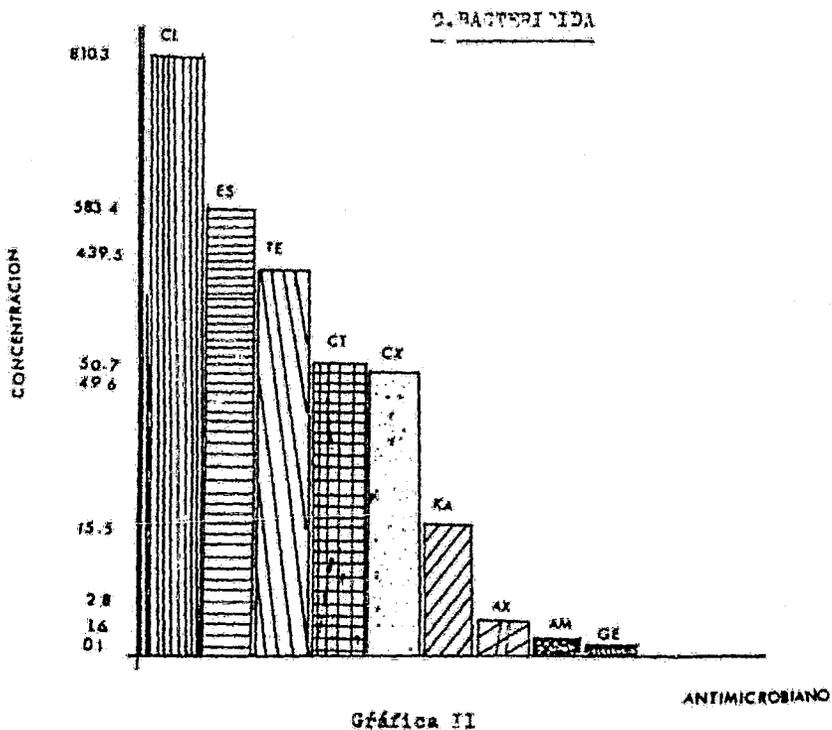


ES=Estreptomocina

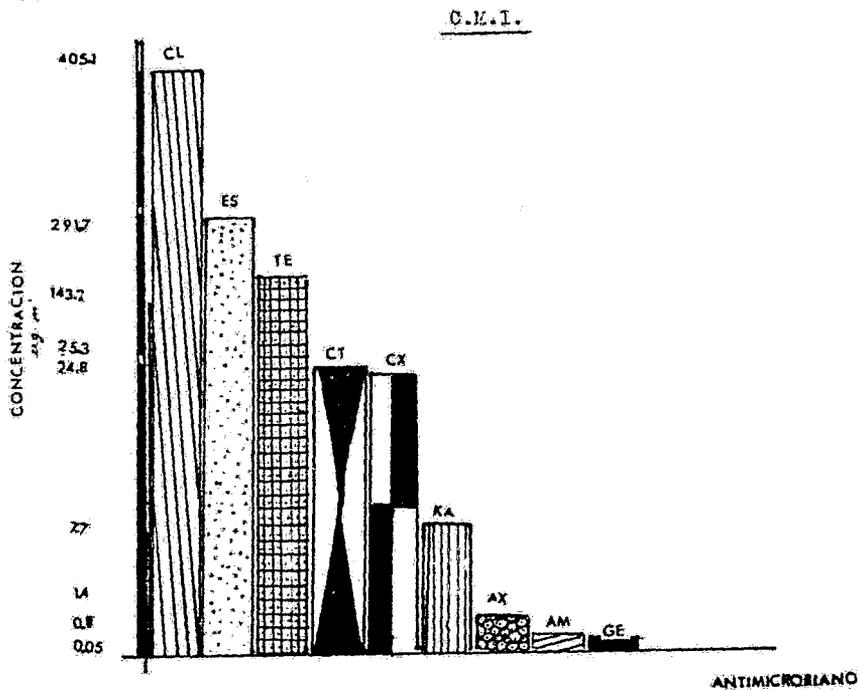
TE=Tetraciclina

Tomando como base los datos anteriores (cuadro No. 2), como resultado de su representación gráfica, tenemos las gráficas II, III, IV y V. Considerando que los valores obtenidos tienen rangos extremos se hizo necesario el uso de dos escalas.

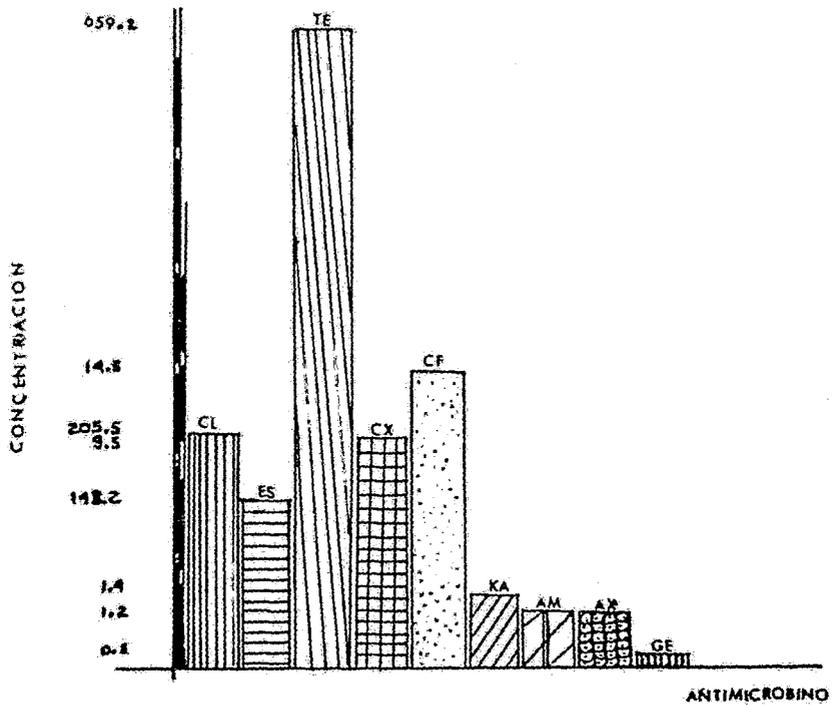
METODO DE DILUCION EN PLACA



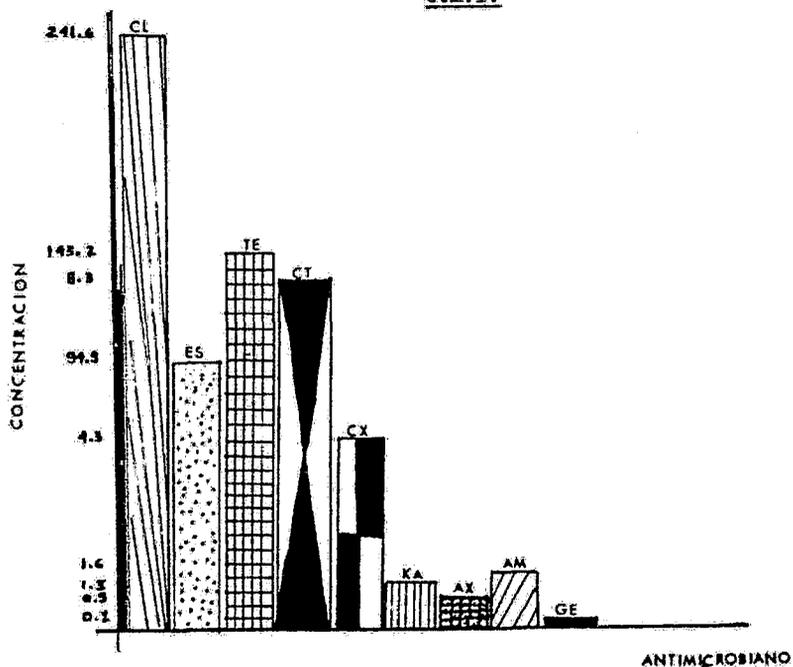
MÉTODO DE DILUCION EN PLACA



Grafica III

METODO DE DILUCION EN TUBOG. BACTERICIDA

Gráfica IV

METODO DE DILUCION EN TUBOC.M.I.

Gráfica V

Los resultados obtenidos del Método de Microtitulación - tanto en placa como en tubo, que se emplean para determinar el efecto Sinérgista ó Antagonista, los presentamos en forma objetiva y representativa .

La forma de ejemplificar es la siguiente:

Microtitulación en Tubo.— Cepa No. 45

Los valores de su C.M.I. obtenidos de su aplicación, utilizando Amoxicilina y Gentamicina por este método, son los siguientes:

Amoxicilina	Gentamicina	micro-gramos/ml.
0.39	0.09	

Tomando como base estos datos se utilizaron diluciones mayores y menores que éstas, para cada uno de los antimicrobianos se utilizaron de Gentamicina desde 0.2 hasta 0.01 micro-gramos/ml en diluciones seriadas; y de Amoxicilina desde 6.2 hasta 0.01 micro-gramos/ml también en diluciones seriadas en total se pusieron 100 tubos de 13x100 en diez filas de 10 cada una, los cuales se membretaron y numeraron de izquierda a derecha diluciones decrecientes de Gentamicina; y de adelante para atrás diluciones decrecientes de Amoxicilina.

De cada uno de los antimicrobianos se colocó un volumen de 0.25 ml, una vez que se concluye el llenado de los tubos con los antimicrobianos se agitan para mezclar perfectamente.

Inoculación.— Cada uno de los tubos se inocula con 0.5 ml. de la cepa diluída (igual a la empleada para el método de dilución en tubo), se agitan nuevamente, se incuban a 37°C por 18 a 24 horas.

Lectura e Interpretación.— La lectura consiste en determinar la C.M.I. por el desarrollo visible y la concentración bactericida se precisa después de sembrar en cuadros de gelosa sangre humana 4 diluciones anteriores donde se presentó el desarrollo visible, sembrando incluso donde se observó éste.

Para conocer los datos que nos determinarán, efectos Sinergistas se ideó el siguiente patrón:

GENTAMICINA

AMOXICILINA

	12.5	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01
12.5											
6.2											
3.1											
1.5											
0.78											
0.39											
0.19											
0.09											
0.04											
0.02											
0.01											

Para cada una de las 48 cepas, se construyó un patrón similar. A continuación se dan los resultados obtenidos en forma resumida. En la primera columna se dan los resultados de los antimicrobianos aplicados en forma independiente.

METODO DE MICROTITULACION EN PLACA C. M. I.

<u>No. de Cepa</u>	<u>INDEPENDIENTES</u>		<u>COMBINADOS</u>	
	<u>AMOXICILINA-GENTAMICINA</u>		<u>AMOXICILINA-GENTAMICINA</u>	
				<u>NA</u>

1	3.1	0.39	0.04	3.1
2	1.5	0.19	0.39	3.1
3	3.1	0.39	0.04	3.1
4	3.1	0.39	0.78	3.1
5	3.1	0.39	0.39	3.1
6	3.1	0.39	0.04	3.1
7	3.1	0.39	0.04	3.1
8	3.1	0.39	0.39	3.1
9	3.1	0.39	0.04	3.1
10	6.2	0.39	0.04	3.1
11	3.1	0.39	0.04	3.1
12	3.1	0.39	0.39	3.1
13	3.1	0.39	0.39	3.1
14	3.1	0.39	0.39	3.1
15	3.1	0.39	1.5	3.1

16	3.1	0.39	0.19	3.1
17	3.1	0.39	0.19	3.1
18	3.1	0.39	0.19	3.1
19	3.1	0.39	0.04	3.1
20	3.1	0.39	0.04	3.1
21	3.1	0.39	0.04	3.1
22	3.1	0.39	0.39	3.1
23	6.2	0.39	0.39	3.1
24	3.1	0.39	0.39	3.1
25	3.1	0.39	0.04	3.1
26	3.1	0.39	1.5	3.1
27	3.1	0.39	1.5	3.1
28	3.1	0.39	0.39	3.1
29	3.1	0.39	1.5	3.1
30	3.1	0.39	0.01	3.1
31	3.1	0.39	1.5	3.1
32	3.1	0.39	1.5	3.1
33	3.1	0.39	1.5	3.1
34	3.1	0.39	0.19	3.1
35	3.1	0.39	0.19	3.1
36	1.5	0.39	0.19	3.1
37	3.1	0.39	0.19	3.1
38	3.1	0.39	1.5	3.1
39	3.1	0.39	0.78	3.1
40	3.1	0.39	0.39	3.1

10	1.5	12.5	0.19	0.19
11	3.1	12.5	0.19	12.5
12	1.5	12.5	0.19	0.19
13	1.5	12.5	0.19	12.5
14	1.5	12.5	0.19	12.5
15	1.5	12.5	0.19	0.19
16	1.5	12.5	0.19	0.19
17	1.5	12.5	0.19	0.19
18	1.5	12.5	0.19	0.19
19	1.5	25.0	0.19	0.19
20	1.5	12.5	0.19	0.19
21	1.5	12.5	0.19	0.19
22	1.5	25.0	0.19	0.19
23	3.2	12.5	0.19	12.5
24	1.5	25.0	0.19	12.5
25	1.5	12.5	0.19	12.5
26	1.5	25.0	0.19	12.5
27	1.5	12.5	0.19	12.5
28	1.5	25.0	0.19	12.5
29	1.5	12.5	0.19	12.5
30	1.5	12.5	0.19	6.2
31	1.5	25.0	0.19	25.0
32	1.5	25	0.19	6.2
33	1.5	12.5	0.39	0.19
34	1.5	12.5	0.39	0.19

35	1.5	25.0	0.19	12.5
36	1.5	12.5	0.19	3.1
37	3.2	12.5	0.19	12.5
38	1.5	12.5	0.39	0.19
39	1.5	12.5	0.39	0.19
40	1.5	12.5	0.19	6.2
41	1.5	12.5	0.19	6.2
42	6.2	25.0	0.78	25.0
43	1.5	25.0	0.39	0.19
44	1.5	25.0	0.19	12.5
45	1.5	25.0	0.19	1.5

Con los datos obtenidos, de estas dos combinaciones se formaron patrones, los que se constituyeron con grupos de clases y frecuencias dando como resultado:

GENTAMICINA - AMOXICILINA.-

- 1.- 3.1/0.04 micro-gramos/ml.
 2.- 3.1/0.39
PATRON 3.- 3.1/1.5
 4.- 3.1/0.19
 5.- 3.1/0.78

Patrón 1.- 1,3,6,7,9,10,11,19,20,21,25,30,42,45.

Patrón 2.- 2,4,5,12,13,14,18,22,23,24,28,40,44.

Patrón 3.- 15,26,27,31,32,33,38,41,43.

Patrón 4.- 16,17,34,35,36,37.

Patrón 5.- 4,39.

AMPICILINA -KANAMICINA.-

	1.- 0.19/0.19
<u>PATRON</u>	2.- 0.19/12.5
	3.- 0.39/0.19
	4.- 0.19/25
	5.- 0.19/3.1

Patrón 1.- 1,4,5,6,7,8,10,12,15,16,17,18,19,20,21,22.

Patrón 2.- 3,9,11,13,14,23,24,25,26,27,28,29,35,37,44.

Patrón 3.- 33,34,38,39,43.

Patrón 4.- 31,42.

Patrón 5.- 2,30,32,36,40,41,45.

El número de cepas que salieron elegidas por medio de los números aleatorios son las siguientes:

AMOXICILINA-GENTAMICINA. AMPICILINA-KANAMICINA.

Patrón 1 : CEPA 45	Patrón 1 : CEPA 12
Patrón 2 : CEPA 22	Patrón 2 : CEPA 35
Patrón 3 : CEPA 33	Patrón 3 : CEPA 32
Patrón 4 : CEPA 35	Patrón 4 : CEPA 31
Patrón 5 : CEPA 39	Patrón 5 : CEPA 45

Con estas cepas resultantes, se llevó a cabo el Método de Microtitulación en Tubo; siendo los resultados los siguientes:

Teniendo como base los resultados de la microtitulación en placa, para éste se utilizaron 10 diluciones de cada uno de los antimicrobianos.

CEPA 45

GENTAMICINA

AMOXICILINA

G/A	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01
6.2										
3.1										
1.5										
0.78					R/V	R	R	R	R	R
0.39						R/V	R	R	R	R
0.19					R/V	R	R	R	R	R
0.09					R/V	R	R	R	R	R
0.04					R/V	R	R	R	R	R
0.02					R/V	R	R	R	R	R
0.01					R/V	R	R	R	R	R

CEPA 22

GENTAMICINA

AMOXICILINA

G/A	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01
6.2										
3.1										
1.5										
0.78										
0.39										
0.19										
0.09						R/V	R	R	R	R
0.04						R/V	R	R	R	R
0.02						R/V	R	R	R	R
0.01						R/V	R	R	R	R

CEPA 35

GENTAMICINA

SMOXICILINA

G/A	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01
6.2										
3.1										
1.5										
0.78				R	V	R	R	R	R	R
0.39				R/V	R	R	R	R	R	R
0.19					R/V	R	R	R	R	R
0.09				R	V	R	R	R	R	R
0.04				R/V	R	R	R	R	R	R
0.02				R/V	R	R	R	R	R	R
0.01				R/V	R	R	R	R	R	R

CEPA 36

GENTAMICINA

AMOXICILINA

<u>G/A</u>	<u>6.2</u>	<u>3.1</u>	<u>1.5</u>	<u>0.78</u>	<u>0.39</u>	<u>0.19</u>	<u>0.09</u>	<u>0.04</u>	<u>0.02</u>	<u>0.01</u>
<u>6.2</u>										
<u>3.1</u>										
<u>1.5</u>										
<u>0.78</u>					<u>R/V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
<u>0.39</u>				<u>R</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
<u>0.19</u>					<u>R/V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
<u>0.09</u>				<u>R</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
<u>0.04</u>				<u>R</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
<u>0.02</u>				<u>R</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
<u>0.01</u>				<u>R</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>

15

DEPA 39

GENTAMICINA

AMOXICILINA

G/A	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01
6.2										
3.1										
1.5										
0.78					R/V	R	R	R	R	R
0.39						R/V	R	R	R	R
0.19					R/V	R	R	R	R	R
0.09					R/V	R	R	R	R	R
0.04					R/V	R	R	R	R	R
0.02					R/V	R	R	R	R	R
0.01					R/V	R	R	R	R	R

DEPA 12KANAMICINAAMPICILINA

<u>K/A</u>	<u>25</u>	<u>12.5</u>	<u>6.2</u>	<u>3.1</u>	<u>1.5</u>	<u>0.78</u>	<u>0.39</u>	<u>0.19</u>
<u>6.2</u>								
<u>3.1</u>								
<u>1.5</u>								
<u>0.78</u>				R/V	R	R	R	R
<u>0.39</u>			R	V	R	R	R	R
<u>0.19</u>				R/V	R	R	R	R
<u>0.09</u>				R/V	R	R	R	R
<u>0.04</u>				R/V	R	R	R	R
<u>0.02</u>				R/V	R	R	R	R
<u>0.01</u>				R/V	R	R	R	R

CEPA 35KANAMICINAAMPICILINA

K/A	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19
6.2								
3.1								
1.5								
0.78			R/V	R	R	R	R	R
0.39			R/V	R	R	R	R	R
0.19			R/V	R	R	R	R	R
0.09			R/V	R	R	R	R	R
0.04			R/V	R	R	R	R	R
0.02			R/V	R	R	R	R	R
0.01			R/V	R	R	R	R	R

CEPA 32

KANAMICINA

AMPICILINA

K/A	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19
6.2								
3.2								
1.5								
0.78				R/V	R	R	R	R
0.39			R/V	R	R	R	R	R
0.19		R	V	R	R	R	R	R
0.09		R	V	R	R	R	R	R
0.04		R	V	R	R	R	R	R
0.02		R	V	R	R	R	R	R
0.01		R	V	R	R	R	R	R

CEPA 31

KANAMICINA

AMPICILINA

K/A	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19
6.2								
3.1								
1.5								
0.78				R/V	R	R	R	R
0.39			R/V	R	R	R	R	R
0.19		R	V	R	R	R	R	R
0.09			R/V	R	R	R	R	R
0.04		R/V	R	R	R	R	R	R
0.02		R	V	R	R	R	R	R
0.01		R	V	R	R	R	R	R

CEPA 4SKANAMICINAAMPICILINA

K/A	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.78	0.39	0.19
6.2								
3.1								
1.5								
0.78								
0.39								
0.19			R	V	R	R	R	R
0.09			R/V	R	R	R	R	R
0.04			R/V	R	R	R	R	R
0.02			R/V	R	R	R	R	R
0.01		R	V	R	R	R	R	R

Las iniciales significan:

R = RESISTENCIA (C. BACTERICIDA)

V = VISIBLE CRECIMIENTO (V.M.I.)

A continuación se dá de una forma resumida los resultados de la aplicación de las dos combinaciones utilizadas, en las 10 cepas, utilizando los dos métodos de microtitulación tanto en placa como en tubo.

CEPA	D P			D T				
	AMOX+GENTA	AMOX	GEN	AMOX+GENTA	AMOX	GEN		
45	0.04	3.1	3.1	0.39	0.78	0.39	0.39	0.09
22	0.39	3.1	3.1	0.39	0.09	0.19	1.5	0.39
33	1.5	3.1	3.1	0.39	0.78	0.39	1.5	0.19
35	0.19	3.1	3.1	0.39	0.78	0.39	0.39	0.19
39	0.78	3.1	3.1	0.39	0.78	0.39	0.78	0.19

CEPA	D P			D T				
	AMPI+KANA	AMPI	KANA	AMPI+KANA	AMPI	KANA		
12	0.19	0.19	1.5	12.5	0.78	3.1	0.78	1.5
35	0.19	12.5	1.5	25.0	0.78	6.2	3.1	1.5
32	0.19	6.2	1.5	25.0	0.78	3.1	0.39	0.78
31	0.19	25.0	1.5	25.0	0.78	3.1	0.78	0.78
45	0.19	1.5	1.5	25.0	0.19	3.1	1.5	1.5

DISCUSSION

DISCUSION

Los métodos empleados para investigar la Sensibilidad de los antimicrobianos en gérmenes patógenos, son los que se utilizan con más frecuencia en la actualidad, son métodos muy sensibles, sobre todo el de Dilución en Tubo con el cual se llegó a encontrar concentraciones de 0.09 micro-gramos/ml., de antimicrobiano por lo que se logró precisar la Resistencia o Sensibilidad mostrada por las cepas a los diversos antimicrobianos.

El método de Kirby-Bauer fue el que nos proporcionó los datos de la Resistencia o Sensibilidad de los gérmenes estudiados el primer dato que nos proporcionó fue la alta incidencia de las cepas resistentes a Cloxamfenicol, la concentración de los discos de este antibiótico utilizados fue de 30 microgramos; al utilizar métodos más sensibles no fue con objeto de conocer algo que ya se conocía, sino el conocer hasta que cantidad de Antibiótico se presentaba esta Resistencia.

Este dato fue con un fin, se puede decir que, hasta cierto punto estadístico; independientemente de que este fue el camino que nos guió para que se llevara a cabo nuestro trabajo.

El método de Difusión de Kirby-Bauer, es de un uso múltiple para determinar la sensibilidad de los gérmenes patógenos, se usan a la vez varios antimicrobianos de amplio espectro, tales como Estreptomina, Kanamicina etc.

El paso a seguir después de esta información fue el de emplear métodos más sensibles, utilizando para

este efecto los Métodos de Dilución en Placa y Dilución en Tubo, dándonos éste un rango de mayor sensibilidad, - es muy laborioso, sin embargo tiene varias ventajas: Método de Dilución en Placa.

1.- Es una misma placa se pueden probar más - de 20 cepas diferentes.

2.- Las placas preparadas con las diluciones de los antimicrobianos tiene un período de duración efectiva de 4 días.

3.- Las soluciones concentradas de los antimicrobianos pueden guardarse por un mes en el congelador.

4.- Los resultados se conocen a las 24 horas.

5.- Siendo este método más sensible y al emplearse soluciones seriadas de antimicrobianos, nos permite investigar la concentración a la cual las cepas son sensibles o resistentes a ellos.

6.- En comparación con el Método de Kirby-Bauer es más exacto, ya que en el método de difusión al emplearse discos de concentración uniforme, el informe que nos dá es si el germen en estudio es sensible o resistente a la acción indicada por los discos.

Pero en caso, como el que se presentó durante la epidemia, es mejor utilizar métodos de mayor sensibilidad para encontrar concentraciones adecuadas de antimicrobianos y evitar, hasta donde sea posible, la resistencia de los gérmenes patógenos.

Método de Dilución en Tubo.— Este es el método de acuerdo con los resultados fue el más sensible, ya que se llegaron a detectar cantidades de antimicrobianos hasta de 0.09 micro-gramos/ml., es un método muy laborioso, pero al mismo tiempo proporciona información de mucha validez, en este método también se usan diluciones seriadas de antimicrobianos, permitiéndonos conocer la concentración exacta a la cual son sensibles o resistentes, empleando esta técnica la información se nos proporciona a las 48 horas, teniendo ésto aparentemente como desventaja. La seguridad de esta técnica son la semejanza en condiciones.

Una vez que se tiene todo el material requerido el trabajo que se lleva a cabo no es tan pesado.

Con el uso de los tres métodos, se logró analizar, por lo menos en estudios hechos "in vitro", cual era el antimicrobiano que se substituyese al Cloramfenicol.

A continuación se muestra los grados de sensibilidad, utilizando los tres métodos:

<u>Dilución en Placa</u>	40 Resistentes
	5 Sensibles
<u>Dilución en Placa</u>	44 Resistentes
	1 Sensible
Dilución en Tubo	41 Resistentes
	4 Sensibles

Estos datos son en relación a la acción de Cloramfenicol.

Los datos que nos proporcionó la aplicación - de estas dos técnicas, fue el conocimiento de sus C.M.I. respectivas. Con este tipo de información el paso a seguir fue el llevar a cabo estudios "in vitro", de combinaciones de antimicrobianos, y ver si dichas combinaciones eran efectivas o por lo contrario tenían efectos antagonistas.

Para este fin se emplearon las técnicas de mi crotitulación tanto en placa como en tubo, observándose igualmente una mayor seguridad y confiabilidad en los da tos provenientes del método de dilución en tubo por lo - cual, se vuelve a recomendar las técnicas de dilución en tubo para estudios que se lleven a cabo en caso de pre-- sentarse epidemias.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Con lo anteriormente revisado podemos decir que los objetivos y fines que se tuvieron al iniciar este trabajo, se cumplieron.
- 2.- El mejor método para el trabajo de rutina, en los laboratorios es el Método de Difusión (Kirby-Bauer), ya que presenta muchas ventajas sobre las otras técnicas, su método y resultados están standardizados, lo cual permite tener un margen de mayor seguridad al llevar a cabo los trabajos de rutina.
- 3.- De los otros métodos utilizados podemos concluir que el que nos dio un rango de mayor sensibilidad fue el de Dilución en Tubo, ya que con éste se llegó a detectar concentraciones hasta de 0.09 microgramos/ml de antimicrobiano; el cual tiene como seguridad o confiabilidad, la semejanza existente en condiciones ambientales del microorganismo dentro del organismo.
- 4.- La Gentamicina fue el antibiótico, que en menor concentración resultó ser efectivo para Salmonella typhi Vi resistente a Cloramfenicol. Esto se logró precisar por medio del Método de Dilución en Tubo.
- 5.- En caso de que se presenten epidemias, es necesario llevar a cabo estudios a fondo de los antimicrobianos empleados, ya que en muchas ocasiones éstos son usados en forma inadecuada.

- 6.- De las combinaciones utilizadas en el presente trabajo, se puede concluir que no tienen efectos positivos, sino por el contrario tienen acciones antagónicas o contrarias.
- 7.- La combinación de Antimicrobianos sólo se recomienda en casos extremos, ésta debe ser con mucha reserva y con sumo cuidado; ya que la aplicación de éstos en forma inadecuada lo único que trae como consecuencia es un alto porcentaje en la incidencia de cepas resistentes de gérmenes patógenos, que en casos de epidemias tienen como resultado un alto grado de mortalidad.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allan Watz., Marvin J., et al. Recent Microbiological Studies with Gentamicin. The Journal of Infectious Diseases. 119 ; 4. 1963.
- 2.- Anderson G., Theodore. Testing of Suceptibility to - Antimicrobial Agents and Assay of Antimicrobial - - Agents in body Fluids. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Micro biology. Mareyland 1970.
- 3.- Back. J.A., Buono N., et al. In vitro and in vivo - Sinergism of Mixture of Penicilins. Antimicrobial - Agents and Chemotherapy. American Society of Micro- biology. N.Y. 1970.
- 4.- Bauer A.E., et al. Antibiotic suceptibility testing by standarized single method. American Jorنال Clinical Pathology 45 : 439 - 496.
- 5.- Calderón E., Conceptos Clínicos de Infectología Pe- diátrica. México 1973.
- 6.- Carre I. J. Guía para el uso de la Quimioterápica en Pediatría. University of Belfast.
- 7.- Cooper D., Henruth M., et al Recent Develomets in the Chemistry of Gentamicin. 4. 5. Chicago Illinois.
- 8.- Davies J.R., Benvenste et al. Aminoglycosides Biolo- gical Effects of Molecular Manipulation. The Journal of Infectious Diseases 119. Chicago Illinois.

- 9.- Edwards. P.R., Ewing W. H. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company Atlanta - Georgia 1972.
- 10.- Fisher Sir Ronald et al., Statistical Tables of Biological Agricultural and Medical Research. London.
- 11.- Garrod and O'Grady., Antibiotics and Chemotherapy., Livingstone., London 1971.
- 12.- Hahn Fred., Mechanism of Action of Gentamicin., The Journal of Infectious Diseases. 119., Chicago Illinois.
- 13.- Harrow and Mazur Abraham., Bioquímica Básica., Interamericana, S.A. México 1967.
- 14.- Jackson, G. and Finland M., Comparison of Methods for determining Sensitivity of Bacteria to Antibiotics., Arch., Int., Med., 88 : 446 - 460.
- 15.- Jedin Jean., A Report of Bactericidal Action of the Kanamycin - Penicillin Association., Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale : 39 6., Bélgica 1959.
- 16.- Kenneth L., Rinikart Jr. Comparative Chemistry of the Aminoglycoside and Aminocyclitol Antibiotics., The Journal of Infectious Diseases., 119., Chicago Illinois.

- 17.- Kucers. A., The use of Antibiotics., Meical Borks - L.T.D. London 1972.
- 18.- Lilly Eli and Company., Datos de Estudios de las Ce fanosporinas., Indianapolis Indiana 1972.
- 19.- Medical Letter., Inc. 56., Harrison Street New Ro-- chelle., 14., 1972.
- 20.- Methods of Microbiological Sensitivity Plate Tes-- ting Manual of Products and Laboratory Procedures., Meryland 1970.
- 21.- Sabath L., Steigbigel and Finland M., Synergistic - Penicillin Combinations for Treatment of human uri-- nary-tract infections Antimicrobial Agentes and Che motherapy 1966: 149-165.
- 22.- Salle A. J., Bacteriología., Gustavo Gili., Barcelo na 1965.
- 23.- Seneca Harry., Biological Basis of Chemotherapy of Infections and Infestations., Davies Company Phila-- delphia 1971.
- 24.- Smith Charles. B. Danes Peter et al. Use of Genta-- micin in combinations with other antibiotics., The Journal of Infections Diseases., 119., Chicago - - Illinois 1969.
- 25.- Vázquez V., Calderón E., et al., Cloramphenicol Re-- sistant Strain of Salmonella typhosa., The New En-- gland Journal of Medicine., I., 1972.

- 26.- William., Kirby and Harrold et al., Gentamicin in -
Vitro Studies., The Journal of Infectious Diseases.
119., Chicago Illinois 1969.