

62



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"EL USO DEL METODO DE DILUCION EN TUBO
COMO PRUEBA TAMIZ EN EL ANALISIS
COMPARATIVO DE PENICILINAS SEMISINTETICAS
DE DIFERENTES LABORATORIOS".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SANCHEZ CABRERA RAUL EMANUEL

ASESOR: MTRO. JUAN FRANCISCO SANCHEZ RUIZ

MEXICO, D, F.

MAYO 2002



LO HUMANO
EJE DE
NUESTRA REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

“ Todo en la vida es un ciclo, el cual tiene un comienzo y un fin; pero todo fin puede ser el comienzo de un nuevo y mejorado ciclo.”

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS.

Gracias:

A Dios: Por todo o que me ha dado y lo que no; y por los caminos que me dará a recorrer, ya que aunque nuestra relación no es muy frecuente, siempre tengo la confianza de encontrarlo ahí y en todo momento.

A mis padres: Por todo el apoyo, consejos, regaños, cariño, confianza y sobre todo por guiarme en todo momento y en cualquier situación. En especial a mi madre por todo lo vivido hasta hoy y lo que nos falta por vivir; además contigo las palabras sobran pues me conoces mejor que nadie.

A mis hermanas: Por ser como son y brindarme su confianza.

A Mercedes y a sus padres: Por creer en mi, por su confianza, por su comprensión, y por la larga espera, la cual no termina.

A Fernanda: Por todo lo que significas y por lo que serás y me ayudarás a ser durante el resto de mi vida. Mi pequeña inspiración, mi pequeño amor.

Al resto de mis familiares: Por ser una competencia leal y motivadora para superarme y superarlos. En especial a Francisco por sus buenos y malos consejos.

A mis amigos: Por todos los deseos buenos o malos, por su confianza, por su apoyo, y simplemente por su amistad. (Ulises, Norma, Luis, Silvia, etc....); en especial a Nancy Espinosa por su valiosa colaboración y guía en la elaboración de este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis Profesores: Por transmitirme a lo largo de mi vida académica sus conocimientos, experiencias y por darme su amistad.

A mis Profesores del L-313: Dr. Rubén Marroquín, Q.F.B. Yolanda Flores, M.C. Maurilio Flores, Q.F.B. Dora A. González, por su ayuda en la realización de este trabajo, por su paciencia, consejos y por su amistad.

A mis sinodales: Mtro. Juan Francisco Sánchez Ruiz, Dr. Rubén Marroquín Segura, Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera, Q.F.B. Ma. Luisa Delgado Briseño y Q.F.B. Oscar González Moreno.

A mis amigos del L-313: Por su amistad y compañía en todo momento, y por sumarse a mi lista de amigos.

A mi Asesor: Mtro. Juan Francisco Sánchez Ruiz, por la confianza y por permitirme realizar este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de estudios superiores "Zaragoza": Por darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales en ellas, por abrirme las puertas al conocimiento, por darme las oportunidades de superación, por ser una segunda casa, por crear un profesional que espera servir a su patria con dignidad, y por el orgullo de ser un universitario especialmente zaragozano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE.

ÍNDICE	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.	5
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.	7
1. Generalidades de antibióticos.	7
1.1 Definición de antibióticos.	7
1.2 Clasificación de los antibióticos.	8
1.2.1 Según el efecto que ejercen en una bacteria.	8
1. Bacteriostáticos.	9
2. Bactericidas.	9
1.2.2 Según sus mecanismos de acción en las bacterias.	10
1. Inhibidores de la síntesis de pared celular.	10
2. Con acción en su membrana celular y su permeabilidad.	11
3. Inhibidores de la síntesis de proteínas.	11
4. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.	11
5. Inhibidores de la actividad metabólica o antagonismo competitivo.	12
1.2.3 Según la coloración de Gram.	12
1.2.4 Según su composición química.	12
2. Penicilinas.	14
2.1 Mecanismo de acción y actividad.	14
2.2. Estructura.	14
2.3 Clasificación.	16
2.4 Penicilinas naturales y semisintéticas.	17
1. Naturales.	17
2. Semisintéticas.	18
3. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana.	19
3.1 Características de un agente microbiano de elección.	19
3.2 Pruebas de sensibilidad microbiológica en fármacos antimicrobianos.	20
3.2.1 Pruebas de dilución en tubo o en caldo.	22
1. CIM	23
2. CBM o CLM	24
3.2.2 Pruebas de dilución en agar.	26
3.2.3 Pruebas de difusión en agar.	26
3.2.4 Pruebas automatizadas.	27
4. Monografías de los antibióticos empleados.	28
4.1 Dicloxacilina.	28
4.1.1 Nombre, estructura y fórmula química.	28
4.1.2 Propiedades Físicoquímicas.	28
4.1.3 Ensayo de potencia del antibiótico	29
4.1.4 Características farmacológicas.	29
A. Modo de acción y espectro antibacteriano.	30
B. Absorción, difusión y excreción.	30
C. Administración y dosis.	31
D. Presentación.	32
E. Efectos Tóxicos y colaterales.	32
4.2 Ampicilina.	33
4.2.1 Nombre, estructura y fórmula química.	33
4.2.2 Propiedades Físicoquímicas.	33
4.2.3 Ensayo de potencia del antibiótico	34
4.2.4 Características farmacológicas.	35
A. Modo de acción y espectro antibacteriano.	35
B. Absorción, difusión y excreción.	37

C. Administración y dosis.	38
D. Presentación.	39
E. Efectos Tóxicos y colaterales.	39
4.3 Amoxicilina.	40
4.3.1 Nombre, estructura y fórmula química.	40
4.3.2 Propiedades Físicoquímicas.	40
4.3.3 Ensayo de potencia del antibiótico	41
4.3.4 Características farmacológicas.	41
A. Modo de acción y espectro antibacteriano.	41
B. Absorción, difusión y excreción.	42
C. Administración y dosis.	43
D. Presentación.	44
E. Efectos Tóxicos y colaterales.	44
PROBLEMA A RESOLVER.	45
OBJETIVOS.	46
HIPÓTESIS.	47
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.	48
DISEÑO ESTADÍSTICO	49
DISEÑO EXPERIMENTAL.	50
DIAGRAMA DE FLUJO.	52
MÉTODOS.	53
I. Preparación de la solución concentrada de bacterias.	53
II. Preparación del inóculo bacteriano.	53
III. Estandarización del inóculo.	54
IV. Preparación de las diluciones de antibiótico.	55
V. Inoculación de los tubos de prueba con el inóculo bacteriano diluciones de antibiótico.	estandarizado y las 55
VI. Lectura de la turbidez.	56
VII. Siembra de placas para la corrida de prueba.	57
VIII. Análisis Espectrofotométrico.	57
RESULTADOS.	59
a) Dicloxacilinas.	59
b) Ampicilinas.	65
c) Amoxicilinas.	72
- RESULTADOS ESTADÍSTICOS.	77
1. Análisis de regresión lineal para binomios de antibióticos (%T)	77
2. Promedios de las CIM y CBM de los antibióticos.	77
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	79
CONCLUSIONES.	80
SUGERENCIAS.	82
ANEXOS	83
I. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	83
A) Medio de cultivo 1.	83
B) Medio de cultivo agar soya tripticaseína	83
II. GLOSARIO.	84
III. FOTOGRAFIA.	87
IV. ESQUEMA DEL MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO.	92
V. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO GENERAL.	92
REFERENCIAS.	93

RESUMEN.

En México la existencia de enfermedades bacterianas hace necesario tener a la mano antibióticos que permitan combatirlos, siendo de los más empleados las penicilinas semisintéticas; la gran demanda de estas ha llevado a la aparición de diferentes laboratorios productores que tratan de sacar el mejor producto al menor costo, por lo que se necesita de una metodología que sirva como tamiz para comparar y evaluar las diferencias y similitudes de estos productos. Por lo que en el presente trabajo se empleo el método de dilución en tubo para la evaluación comparativa entre diferentes laboratorios productores de penicilinas semisintéticas como: dicloxacilina, ampicilina y amoxicilina, determinándose turbidez, % de transmitancia, concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM); observándose de acuerdo a un análisis de regresión lineal que no existen diferencias significativas en la mayoría de los antibióticos de los diferentes laboratorios productores con igual principio activo en el caso de las penicilinas semisintéticas; y que la metodología empleada puede utilizarse como tamiz en la evaluación y comparación de antibióticos de este tipo.

INTRODUCCIÓN.

Desde los tiempos remotos el hombre ha convivido con el mundo bacteriano, siendo este un compañero evolutivo el cual le ha ocasionado enfermedades y pérdidas a lo largo de la historia. De ahí que uno de los sueños del hombre ha sido tratar de combatir a los microorganismos por diversos métodos. En un inicio se pensó que las fuerzas divinas curaban las enfermedades, sin embargo ante algunos aciertos, casualidades y el descubrimiento de varias plantas se observó que esto no era tan real. De esta forma con el avance científico y tecnológico de la humanidad, el sueño de la bala mágica de Erlich quien buscaba un compuesto químico capaz de exterminar a los microorganismos dio la pauta a otros científicos en la búsqueda de un arma contra las enfermedades bacterianas; en el caso de los antibióticos fue Alexander Fleming más por casualidad que por ensayo quien descubrió la bala mágica contra las bacterias, esta fue la penicilina, la cual no solo ofreció la cura a una amplia gama de padecimientos, sino que también abrió un camino para el desarrollo de otros antibióticos, y con ello el desarrollo de la investigación en la industria farmacéutica y la aplicación clínica de los mismos.

Con el paso del tiempo la industria de los antibióticos ha avanzado en su producción en forma natural y también en su forma sintética, aportando armas a los médicos para el tratamiento de enfermedades bacterianas, sin embargo las bacterias han desarrollado diferentes formas de defensa ante los antibióticos, de ahí que los científicos tengan la necesidad de aplicar técnicas para medir la actividad antimicrobiana de un producto en el desarrollo de medicamentos contra bacterias resistentes. La necesidad de conocer la potencia de un antibiótico contra

una bacteria ha propiciado el desarrollo de diversas técnicas de evaluación como lo es el método de dilución en tubo.

En México el desarrollo de la industria farmacéutica ha dado origen a varios laboratorios productores de antibióticos, los cuales compiten por lanzar al mercado los mejores productos a los mejores precios y de la mejor calidad por lo que hoy se presenta como inquietud la búsqueda de una metodología que sea confiable y reproducible para la evaluación y comparación de antibióticos con el mismo principio activo pero de diferentes laboratorios productores, para establecer una serie de lineamientos que den a los productos de los diferentes laboratorios las mejores características de calidad entre ellos, así como una metodología que se pueda emplear como tamiz durante la producción de antibióticos tomando como parámetros la CIM y la CBM.

FUNDAMENTACIÓN TEORICA.

1. GENERALIDADES DE ANTIBIÓTICOS.

1.1 Definición de Antibiótico.

En 1889 Vuelllemin creó el termino antibiosis para describir la lucha entre diferentes seres vivos para sobrevivir, posteriormente Ward empleo esta palabra para definir el antagonismo microbiano.

El término antibiótico fue propuesto en 1945 por Waksman para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivas.¹

Así el termino antibiótico originalmente se definió como una sustancia química producida por diferentes especies de microorganismos, dotada de actividad antimicrobiana y que en pequeñas concentraciones es capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos.

La definición anterior se enfoca a la producción de antibióticos en forma natural, sin embargo la producción de antibióticos en forma semisintética y sintética ha modificado el termino, quedando la palabra antibiótico como una sustancia producida por un microorganismo o bien una sustancia similar elaborada de forma total o parcial por síntesis química, la cual en bajas concentraciones inhibe el desarrollo de otros microorganismos.² La definición de antibiótico sigue vigente hasta nuestros días y se emplea en sus dos formas, sin embargo en ocasiones podemos encontrar a los antibióticos naturales, semisintéticos y sintéticos englobados en el termino quimioantibióticos.³

1.2. Clasificación de los antibióticos.

El término antibiótico se emplea generalmente englobando a todas las sustancias con acción antimicrobiana, debe tomarse en cuenta que estos compuestos están diseñados específicamente para actuar en un tipo determinado de microorganismos u organismos, obteniendo una clasificación primaria de los antibióticos en: antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios. En este trabajo se emplea al término antibiótico enfocado a su acción antibacteriana.⁴

En la práctica diaria existen varias clasificaciones para los antibióticos, las más empleadas se basan en los siguientes criterios: en la acción del antibiótico sobre la bacteria; según su mecanismo de acción; tomando en cuenta la coloración de Gram, y la agrupación según su estructura química.^{5,6}

1.2.1 Según el efecto que ejercen en una bacteria.

Un antibiótico aplicado a un organismo por la vía que sea, ejerce una acción contra las bacterias o microorganismos sensibles, estos efectos se expresan de dos formas en el caso de los antibacterianos. En el primer caso en forma de lisis o muerte de la bacteria, efecto conocido como bacteriolítico o bactericida. En el segundo caso en forma de inmovilización vital o inhibición de la bacteria, efecto conocido como bacteriostático.

Ambos efectos son útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, pero existen diferencias entre ellos; por lo que se ha clasificado a los antibióticos en bactericidas y bacteriostáticos.⁷ Debe tomarse en cuenta que estas designaciones dependen del tipo de antibiótico y del tipo de microorganismo contra el que se

administra, ya que se pueden presentar ambas características ante diferentes microorganismos, por ejemplo la Penicilina G que es bactericida para cocos Gram positivos y bacteriostática para enterococos.⁸

1. Bacteriostáticos.

Son aquellos que poseen la capacidad de inhibir la multiplicación bacteriana, no matan a la bacteria, pero, detienen su multiplicación, la que puede reanudarse al retirar o agotarse el antibiótico. En este tipo de sustancias la muerte bacteriana puede presentarse como resultado de combinarse la acción del medicamento (inhibición multiplicativa) y la respuesta fagocítica del huésped, este doble mecanismo parece actuar generalmente en enfermedades bacterianas agudas; en lesiones con supuración; esta doble acción no se da por la necrosis y la inoperancia fagocítica, siendo débil la respuesta de este tipo de antibióticos.⁹

Ejemplos de antibióticos bacteriostáticos: Tetraciclinas, Eritromicina, Sulfonamida, Novobiocina, Cloranfenicol.

2. Bactericidas.

Son aquellos que poseen la capacidad de matar a las bacterias. La acción bactericida difiere de la acción bacteriostática en que es irreversible; es decir, que el microorganismo muerto no puede reproducirse más cuando es retirado o pasa el efecto del antibiótico.⁷

El efecto de la bacteriólisis o bacteriostasis se define según diversos mecanismos moleculares del antibiótico sobre la bacteria, este conocimiento es de ayuda para

la interpretación del problema terapéutico, ya que la célula bacteriana con su pared, membrana, citoplasma y múltiples necesidades proteicas para reproducirse, puede ser afectada en cualquiera de estos sectores. De aquí que existan diferentes mecanismos de acción dependiendo de los antibióticos empleados.⁽³⁾ Ejemplos de antibióticos bactericidas: Penicilinas, Cefalosporinas, Aminoglucósidos, Rifampicina, Quinolonas, Monobactámicos y Polimixinas.

1.2.2 Según su mecanismo de acción en las bacterias.

Esta resulta de gran utilidad en el uso simultaneo de diferentes antibióticos, y se basa en sus mecanismos de acción en las células bacterianas; se dividen en:

1. Inhibidores de la síntesis de pared celular:

Las bacterias son microorganismos hiperosmolares respecto a los tejidos y líquido intersticial de los mamíferos, por lo que la síntesis de una pared celular rígida y estable mantiene su integridad en un proceso infeccioso. La inhibición de la síntesis de esta pared tiene generalmente un efecto bactericida, este efecto puede darse según el antibiótico empleado en cualquiera de las tres principales etapas de síntesis del polímero formador de la pared celular llamado peptidoglicano¹⁰; algunos ejemplos de estos antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, fosfomicina, tercoplanina bacitracina.

2. Con acción en la membrana celular y su permeabilidad.

La membrana citoplásmica regula el medio intracelular bacteriano; puede ser lesionada por diversos agentes, los cuales pueden afectar su permeabilidad selectiva actuando como detergentes catiónicos, provocando la salida de sustancias intracelulares,³ algunos antibióticos son afines a la membrana bacteriana y pueden producir al interactuar con ella toxinas letales que los afecten, aun sin afectar al huésped;¹¹ ejemplos de estos antibióticos: polimixinas, colistinas, nistatina, anfotericina B.

3. Inhibidores de la síntesis de proteínas.

Algunos antibióticos son capaces de inhibir la síntesis de proteínas uniéndose a los ribosomas bacterianos, bloqueando así la acción de RNAm, casi siempre es de forma irreversible dando lecturas erróneas de este, y con ello la producción de polipéptidos esenciales para la bacteria en forma anormal, siendo su efecto bactericida, pero cuando la unión del antibiótico al ribosoma es reversible el efecto es bacteriostático;¹² ejemplos de estos antibióticos: cloranfenicol, tetraciclinas, aminoglucósidos, lincomicinas, eritromicinas.

4. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.

Existen aquellos que inhiben selectivamente la RNA polimerasa, bloqueando la síntesis de DNA, dando así un efecto bactericida,^{13,14,15} pero, en ocasiones algunos actúan de forma inhibitoria reversible dando un efecto bacteriostático. Estos antibióticos pueden ser tóxicos no solo a la bacteria, sino también al

huésped por su similitud metabólica de los ácidos nucleicos;¹⁶ ejemplos de estos antibióticos: quinolonas, sulfonamidas, rifampicina, trimetopín.

5. Inhibidores de la actividad metabólica o antagonismo competitivo.

Estos antibióticos compiten por algunos sustratos esenciales para las bacterias impidiendo la síntesis de metabolitos útiles bacterianos, un ejemplo de estos son las sulfonamidas que compiten con el ácido p-amino benzoico impidiendo la síntesis de ácido fólico vital para algunos microorganismos trastornando así la actividad celular normal.^{31,32}

1.2.3 Según la coloración de Gram.

Otra forma de clasificar a los antibióticos es de acuerdo a la tinción de Gram del microorganismo sobre el cual actúan quedando antibióticos para bacterias Gram positivas y antibióticos para bacterias Gram negativas. Ejemplos de antibióticos contra bacterias Gram positivas: penicilinas (bencilpenicilina, dicloxacilina, metilcilina), cefalosporinas (cefalexina, cefalotina), lincomicina, eritromicina, bacitracina. Ejemplos de antibióticos contra bacterias Gram Negativas: polimixinas (polimixina B, colistina, sulfomixina).⁶

1.2.4 Según su composición química.

La clasificación es útil para seleccionar el o los antibióticos a emplearse en el tratamiento de enfermedades simples y polibacterianas,^{17,18} basándose de manera específica en la estructura constitutiva de un grupo y subgrupos de antibióticos

desarrollados a partir de uno base. En forma general los antibióticos según su composición pueden clasificarse como se observa en la tabla 1.

Tipo de antibióticos	Clasificación.
1) Betalactámicos	Penicilinas: naturales (penicilina G), semisintéticas (dicloxacilina) Cefalosporinas: Generación: 1ª (Cefadroxilo), 2ª (Cefuroxima), 3ª (Ceftriazona), 4ª (Ceftazidima) Monobactámicos (Aztreonam) Carbapenems (Imipenem) Inhibidores de betalactamasa (Ac. Clavulanico, Sulbactam)
2) Polipéptidos	Bacitracina, Polimixinas B y E (Colistina), Gramicidina.
3) Aminoglucósidos	Aminociclitolos (Espectinomina) Aminoglucósidos (Amikacina, Estreptomina, Kanamicina)
4) Anfenicoles	Cloranfenicol, Tiamfenicol
5) Tetraciclinas	Vida: media corta (Tetraciclina), media intermedia (Demeclociclina), media larga: Doxicilina
6) Macrólidos	Numero de átomos: 14 (Eritromicina), 15 (Azitromicina), 16 (Miacamicina)
7) Glucopéptidos	Teicoplanina, Vancomicina
8) Lincosaminas	Lincomicina, Clindamicina
9) Sulfonamidas	Acción: corta (Sulfametoxazol), larga (Sulfadoxina), en tubo digestivo (Sulfatalidina), tópica (Sulfacetamida)
10) Inhibidores de la folato reductasa	Trimetropim
11) Quinolonas	Generación: 1ª (Ac. Nalidixico), 2ª o Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)
12) Antimicobacterianos	Antituberculosos (isoniazida), Antileprosos (Dapsona), Atípicos (Rifampicina)
13) Otros	Nitroimidazoles (Metronidazol), Nitrofuranos (Furazolidona), Rifamicinas, Acido fúsidico, Fosfomicina, Mupirocina (Ac. Pseudomonico)

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su composición química.²⁰

2. PENICILINAS.

Los antibióticos Betalactámicos son aquellos que tienen en su estructura un anillo β -lactama, que los hace análogos de la D- alanil – D- alanina, esencial en la inhibición de la síntesis de peptidoglicano.¹⁹ En este grupo de antibióticos encontramos a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenems e inhibidores de la betalactamasa como se observo en la tabla 1.

El termino penicilina se refiere a un grupo de alrededor de 50 antibióticos relacionados químicamente. Toda penicilina tienen una estructura básica: el ácido 6- aminopenicilánico⁷, conformado por un anillo β - lactámico o núcleo. Las moléculas de las penicilinas se diferencian entre si por las cadenas químicas unidas a él y pueden producirse de manera natural y semisintéticamente.⁴

2.1 Mecanismo de acción y actividad.

Las penicilinas bloquean la actividad transpeptidasa de las proteínas fijadoras de la penicilina (PBP). La síntesis de peptidoglicano disminuye y la bacteria muere por efecto osmótico o digerida por enzimas autolíticas. Son bactericidas; de efecto lento y activas sólo en la fase de crecimiento bacteriano.²¹

2.2 Estructura.

Todas las penicilinas tienen la misma estructura básica: al ácido 6 – aminopenicilánico (figura 2), el cual tiene dos anillos, un anillo de tiazolidona (a), unido a un anillo beta lactámico (b) con un grupo amino libre (c) , a este grupo se unen cadenas radicales (R) que dan los diferentes tipos de penicilinas con sus

características y cualidades específicas. (figura 1). La integridad estructural del núcleo de la penicilina es esencial para la actividad antimicrobiana.⁷



Figura 1. Estructura general de las penicilinas.⁷

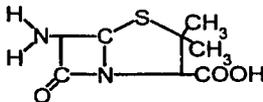


Figura 2. Ácido 6 – aminopenicilánico.

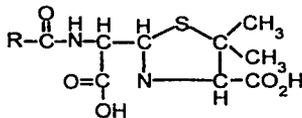


Figura 3. Ácido peniciloico.⁹

El anillo de cuatro elementos o beta lactámico tiene una configuración forzada y su enlace CO-N (enlace beta lactámico) que puede ser hidrolizado por la acción del pH o por la enzima penicilinasas produciendo el ácido peniciloico el cual es inactivo. (figura 3)

En las penicilinas semisintéticas las cadenas están conformadas por grupos voluminosos, cercanos al enlace beta lactámico que protegen a la molécula de la hidrólisis, además estabilizan a la penicilinas a una forma inactiva, que permite continuar la acción del antibiótico.⁹

2.3 Clasificación.

Las penicilinas pueden clasificarse de acuerdo a su modo de producción como naturales y semisintéticas; sin embargo esta clasificación puede hacerse más específica de acuerdo a la estructura y propiedades de las penicilinas semisintéticas, como se observa en las tablas 2 y 3.²²

Grupo	Actividad predominante	Agente	Vía de administración
I. Penicilinas Naturales.	Cocos Gram positivos	Penicilina G Penicilina V Feneticilina.	IM - IV Oral Oral
II. Penicilinas resistentes a las penicilinasas.	<i>S. aureus</i> productor de betalactamasa	Metecilina Nafcilina Oxacilina Cloxacilina	IM - IV IM - IV IM - IV - Oral IM - IV - Oral
III. Aminopenicilinas	Cocos Gram positivos y microorganismos Gram negativos comunes.	Ampicilina Amoxicilina Bacampicilina Amidinopenicilina Asociaciones con Ac. Clavulánico o sulbactam	IM - IV - Oral Oral Oral IM - IV - Oral Oral - IM - IV
IV. Carboxi y ureidopenicilinas.	<i>P. aeruginosa</i> y microorganismo Gram negativos hospitalarios.	Carbenicilina Ticarclina Azlocilina Mezlocilina Piperacilina	IM - IV - Oral IM - IV IM - IV IM - IV IM - IV

Tabla 2. Clasificación de las penicilinas.²¹

Tipo y nombre genérico	Acidoresistencia
Penicilinas Naturales.	
Benzilpenicilina (G)	-
Fenoximetil penicilina (V)	+
Penicilinas semisintéticas.	
- Resistentes a la penicilinas.	
Metilcilina	-
Naftilcilina	+
- Isoxazolil penicilinas.	
Cloxacilina	+
Dicloxacilina	+
Oxacilina	+
- Penicilinas de amplio espectro.	
Ampicilina	+
Amoxicilina	+
Amidinocilina (mecilnam)	a
- Penicilinas antiseudomonas	
Carbenicilina	a
Azlocilina	a
Mezlocilina	a
Piperacilina	a
Ticarcilina	a
a = Se absorbe por intestino, administrarse vía parenteral, + = Acido resistente, - = No ácido resistente.	

Tabla 3. Clasificación de las penicilinas y su acidoresistencia.²

2.4 Penicilinas Naturales y Semisintéticas.

Las penicilinas se obtienen de hongos del genero *Penicillium*, los cuales producen el ácido 6 – aminopenicilánico, las diversas penicilinas poseen cadenas laterales (R) en el grupo 6 – amino (Figura 1 y 2), estas cadenas son necesarias para la acción de la penicilina y pueden adicionarse a la molécula biológicamente (natural) y químicamente (semisintéticas)

1. Naturales.

Son aquellas producidas directamente por un hongo con su cadena lateral incluida unida al núcleo básico, esta puede obtenerse y variarse de acuerdo a

precursores adicionados en el medio de cultivo que inducen al hongo a la producción de una penicilina específica. Por ejemplo usando ácido fenilacético en el medio podemos obtener penicilina G.²² Este tipo de penicilinas son fácilmente afectadas por el pH ácido (jugo gástrico); se inactivan con la enzima β - lactamasa; tienen mayor tendencia a causar hipersensibilidad, y su espectro de actividad es relativamente reducido.²

2.3.2 Semisintéticas.

Son aquellas que se obtienen al inducir a un hongo en la formación de una penicilina sin la adición de precursores de cadena, con lo que se obtiene aislado el ácido 6 – aminopenicilánico sin cadena lateral, o bien, pueden emplearse enzimas como la amidasa (figura 1) que rompe la cadena lateral preexistente en las penicilinas naturales aislándose el mismo ácido, al cual se pueden agregar diferentes cadenas por medio de reacciones químicas, para obtenerse así los diferentes penicilinas semisintéticas.(tabla 2 y 3) Este tipo de penicilinas presentan un mayor espectro de actividad; causan relativamente menor hipersensibilidad, y tienen mayor resistencia al pH y a la enzima bacteriana β - lactamasa.²²

3. MÉTODOS PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La presencia de enfermedades infecciosas en el hombre hacen necesario determinar la sensibilidad o susceptibilidad de un microorganismo ante un antibiótico, lo que constituye una técnica común e importante, en la mayoría de los laboratorios. Los resultados de estas pruebas se usan en la selección de el o los antibióticos idóneos para instaurar el tratamiento en una enfermedad microbiana.²³ Esta metodología comienza al obtenerse los cultivos de los cuales se aísla un agente infeccioso antes de la administración de un antibiótico, ya que si los cultivos son obtenidos después podríamos encontrar inhibición en el desarrollo del microorganismo causal y el crecimiento de microorganismos secundarios no responsables de la enfermedad, o bien, podemos obtener un microorganismo causante que haya desarrollado patrones de resistencia a los antibióticos administrados.

La finalidad del laboratorio al determinar la sensibilidad o susceptibilidad antimicrobiana, es dar al médico información no solo de quien es el causante de la enfermedad, sino también de como podemos combatirlo y a que probable concentración, buscando el antibiótico más apropiado bajo ciertos criterios de elección para administrarlo.²⁴

3.1 Características de un agente antimicrobiano de elección.

Las pruebas de susceptibilidad suelen buscar un agente que tenga las mejores características para su uso, estas son:

- a) Ver que sea el agente más activo contra el patógeno, dentro de una gamma de agentes similares o con la misma acción. (Mayor efecto a menor concentración)
- b) Buscar el agente que presente menor toxicidad al huésped o paciente.
- c) Ser un agente con las características apropiadas que lo ayuden tanto a su absorción, distribución, acción y eliminación en el paciente.
- d) Y por último el punto más difícil; que presente las características anteriores pero que a la vez sea económico y accesible.

Así los resultados terapéuticos dependen del agente de elección con sus características, y depende de otro tipo de variables como: la enfermedad subyacente, la condición clínica del paciente, la aplicación de un drenaje, la desbridación, las propiedades farmacológicas del agente y el uso de agentes terapéuticos adicionales entre otros factores.

Por otra parte el éxito de un antibiótico no solo depende del trabajo del microbiólogo, ya que este sólo recomienda o da resultados de acuerdo a pruebas in vitro, por lo que el médico decide junto con el conocimiento de todos los factores del cuadro clínico, cual es el más apropiado; ya que se encuentran casos donde un agente actúa limitadamente in vitro, pero in vivo da mejores resultados o viceversa, además estas pruebas de laboratorio se realizan en cultivos puros, no mixtos que es la forma en que se pueden encontrar en el paciente.²⁴

3.2 Pruebas de sensibilidad microbiológica en fármacos antimicrobianos.

La sensibilidad o potencia microbiológica es un método práctico y confiable que indica la susceptibilidad de un microorganismo ante un antibiótico determinado, en el menor tiempo y concentración posible.²³

Las pruebas de sensibilidad pueden realizarse empleando diferentes métodos como el de dilución en tubo, dilución en agar, difusión en agar y en forma automatizada, siendo estos dos últimos los más empleados por su sencillez y simplicidad; este conjunto de pruebas también es útil para analizar niveles de antibióticos en suero o en otros líquidos del organismo; en la determinación de niveles inhibidores o tóxicos del fármaco,⁹ pueden complementarse con técnicas como: la determinación de actividad bactericida e inhibitoria en un aislamiento bacteriano, la medición de la actividad antimicrobiana en una combinación de drogas o prueba de sinergia, en la cuantificación de niveles de antibiótico en fluidos corporales y la determinación de la actividad bactericida sérica.

El empleo de las técnicas de sensibilidad antimicrobiana son el medio más adecuado para instaurar un tratamiento y realizar su seguimiento con base en la respuesta clínica del paciente. Este seguimiento trata de mostrar la eficacia del tratamiento antimicrobiano; se realiza con muestras del paciente, observando si en estas el microorganismo infectante ha sido eliminado (cura bacteriológica) o bien, si persiste (falla bacteriológica), tomando en cuenta que no siempre una cura bacteriológica determina un resultado clínico exitoso.

Las pruebas de sensibilidad sirven como guía para el microbiólogo y para el médico, aunque no garantizan la eficacia de un agente antimicrobiano en un

paciente. Estas pruebas realizadas in vitro deben ser reproducibles día a día y de fácil manejo; por lo que los laboratorios clínicos y las industrias productoras de antibióticos tienen la necesidad de normatizar sus pruebas, para obtener los mejores resultados, tomando en cuenta factores como el origen y volumen del inóculo bacteriano, el medio de cultivo y el periodo de incubación.²⁵

3.2.1 Pruebas de dilución en tubo.

Son métodos clásicos para determinar sensibilidad in vitro, y proporcionan resultados cuantitativos o de la concentración de un antibiótico que inhibe a un microorganismo específico. Además es uno de los primeros métodos de sensibilidad antimicrobiana y se emplea como referencia junto al método de dilución en agar.²⁵

En esta prueba de sensibilidad se emplea un inóculo estandarizado de un número de bacterias en medio líquido (aproximadamente de 1×10^9 bacterias/mL). Este inóculo puede estandarizarse de varias formas: a) contando las células bacterianas en cámaras especiales, b) midiendo la densidad óptica del cultivo, c) comparando con subcultivos en agar y 4) por comparación de turbidez visual con un estándar líquido que represente la suspensión de un número conocido de bacterias (Nefelómetro de Mc Farland)²⁴

También se emplean concentraciones decrecientes de antibiótico en tubos con medio de cultivo en caldo que sostendrá al microorganismo, el caldo de uso común es el de Mueller Hinton.

El antibiótico de prueba se prepara a partir de una solución concentrada, que se diluye a diferentes concentraciones en una serie de prueba. Para realizar lo anterior se necesitan estándares de antibióticos en polvo, ya que en ocasiones estos no se encuentran al 100% de actividad por lo que deben ajustarse; la actividad específica es la cantidad de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de un agente presente en un polvo.

Tanto el inóculo de bacterias estandarizado y las soluciones del antibiótico de prueba a diferentes concentraciones son adicionados en volúmenes iguales en tubos con medio de cultivo estéril a volumen definido etiquetados según la serie de diluciones del antibiótico; un tubo se mantiene sin inóculo bacteriano como control negativo y otro se inocula como control positivo.

Después de la incubación se observa la turbidez en la serie de tubos, la que indica crecimiento bacteriano (semejante al control positivo) o que no existió la cantidad suficiente de antibiótico para inhibir el desarrollo del microorganismo, quedando definida la concentración mínima de antibiótico capaz de detener el crecimiento bacteriano por el primer tubo de la serie donde no se presenta turbidez (similar al control negativo) a lo que se le conoce como CIM.²⁴

1. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima)

Por convención la CIM se interpreta como la concentración de antibiótico contenida en el primer tubo de la serie que inhibe el crecimiento visible.²⁵ Mide la capacidad de un antibiótico para inhibir o detener la multiplicación de los microorganismos, los cuales pueden reiniciar su crecimiento al eliminarse la acción o al agotarse el antibiótico, considerándose su efecto como bacteriostático.

En una serie de diluciones el primer tubo sin turbidez determina la CIM, sin embargo podemos encontrar en este y en resto de los de la serie, microorganismos viables inhibidos o bien microorganismo destruidos por el antibiótico dependiendo si este es bacteriostático o bactericida, tomándose en cuenta que aun los antibióticos bactericidas no eliminan totalmente una población bacteriana, por lo que se debe evaluar esta actividad con una secuencia al método de dilución en tubo conocida como determinación de la CBM.²⁴

2. CBM o CLM (Concentración Bactericida Mínima o Concentración Letal Mínima)

Esta representa la mínima concentración de antibiótico que permite vivir a menos del 0.1% de un inóculo bacteriano, o bien, que tiene un efecto letal del 99.9%.

Tomándose en cuenta que un antibiótico puede tener un comportamiento bacteriostático y también bactericida, dependiendo del microorganismo con el que se prueba y de las concentraciones a las cuales se administra.

La determinación de la CBM es una secuencia metodológica de la determinación de la CIM, ya que después de determinar esta, se toma un inóculo de volumen conocido (generalmente 10 μ L) de los tubos de la serie que no presentan turbidez, este inóculo se siembra masivamente en sus correspondientes placas de agar, (la cantidad de antibiótico que se arrastra en el inóculo se elimina por dilución en el medio de cultivo) las placas se incuban (18 a 24 hs) y al siguiente día se determina el número de UFC/mL, esto se realiza de igual forma en los controles, aunque en el control positivo además de sembrarse directamente se puede diluir para medir el efecto letal del 99.9% si el inóculo original es muy grande. Es posible

determinar entre 30 y 300 colonias desarrolladas en una placa, ya que contar números menores o mayores es poco exacto y se lleva tiempo. El número de colonias desarrolladas en los subcultivos del control positivo después de la incubación se usan para comparar el número de UFC/mL del inóculo original.

La CIM y la CBM de un antibiótico se pueden determinar para cualquier bacteria que se desarrolle en medio de cultivo líquido, a temperatura aproximada a 35 °C o la óptima para cada microorganismo y empleando el medio de cultivo de Mueller Hinton u otros diferentes con el agregado de suplementos como cationes y nutrientes para bacterias exigentes; este método se usa para bacterias aerobias como para anaerobias, siendo para las segundas la metodología más lenta y laboriosa, por lo que se recomienda para este tipo de bacterias el método de sensibilidad por dilución o difusión en agar.

Ambas pruebas de laboratorio (CIM y CBM) indican sensibilidades y se encuentran controladas y evaluadas con cepas y antibióticos estandarizados, con lo que es posible descubrir fallas en las técnicas o problemas en los medios y reactivos que se usan. Cuando se determina la sensibilidad con procedimientos no estandarizados sus resultados deben tomarse en cuenta con precaución y comprobarse por otros métodos; es por esto que las pruebas de sensibilidad en aislamientos clínicos importantes se realizan de preferencia en laboratorios de referencia y con experiencia en el manejo de los materiales empleados en la técnica.

Las pruebas de dilución en caldo son adaptables a policubetas para microdilución haciendo más rutinaria la determinación de la CIM, lo que permite ahorrar dinero y dan flexibilidad a probar varios antibióticos a la vez, las microplacas son generalmente preparadas en forma comercial bajo controles de calidad muy estrictos con lo que se aseguran resultados consistentes. Estas microplacas son recomendables para determinar la CIM, pero por su tamaño la manipulación para la CBM es más difícil, por lo que se recomienda el uso de la macroescala.²⁴

3.2.2 Pruebas de dilución en agar.

Estas se practican en placas con medio de cultivo las cuales contienen una dilución seriada del antimicrobiano, la superficie del medio se inocula con un asa calibrada en un punto sin extensión o bien con un dispositivo de replicación para la inoculación múltiple simultánea de microorganismos en una sola placa. Puede emplearse como modificación de la prueba de dilución en tubo cuando se considera la posibilidad del uso simultáneo de dos fármacos antimicrobianos, con el fin de determinar efectos de sinergismo, aditividad o antagonismo.

3.2.3 Pruebas de difusión en agar.

Se utilizan en muchos laboratorios debido a su simplicidad, rapidez y economía. Estas pruebas emplean discos de papel filtro estandarizados impregnados con cantidades fijas de antimicrobianos, se siembra un césped de bacterias en la superficie de una placa con un cultivo estandarizado y se colocan después varios discos impregnados con los diferentes antimicrobianos en la superficie del agar.

Las placas se incuban de 18 a 24 hs y se mide después el diámetro de la zona que no presenta crecimiento alrededor del disco. El diámetro de la zona de inhibición indica si el microorganismo de prueba tiene una sensibilidad alta, intermedia o inadecuada frente al fármaco o a los fármacos en cuestión. Se ha demostrado experimentalmente que la zona inhibidora alrededor del disco esta linealmente relacionada con el logaritmo de la CIM del fármaco medida en pruebas de dilución en tubo.

3.2.4 Pruebas automatizadas.

Estas determinan la sensibilidad microbiana midiendo el efecto inhibitor de los fármacos en medio líquido, mediante el uso de la dispersión luminosa para determinar el crecimiento microbiano en un tiempo estándar, con esta técnica se obtienen resultados en el plazo de unas horas, por lo que cada vez se usa más en laboratorios que realizan grandes cantidades de pruebas.

Las pruebas de sensibilidad microbiana distinguen a los fármacos que pueden ser útiles, de aquellos que son incapaces de proporcionar una posible curación. Para escoger entre los fármacos que pueden ser de utilidad (que inhiben o matan a un microorganismo in vitro), hay que tener en cuenta las propiedades farmacológicas y toxicológicas de estos, su modo de acción (bacteriostáticos o bactericidas), la zona anatómica de infección y la presencia de enfermedades subyacentes por sus efectos sobre la función renal, hepática o cardíaca, lo que puede modificar la

farmacología del antimicrobiano. En particular una zona de inhibición mayor no identifica necesariamente al fármaco más apropiado.⁹

4. MONOGRAFÍAS DE LOS ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS.

4.1 Dicloxacilina.

4.1.1 Nombre, estructura y fórmula química.

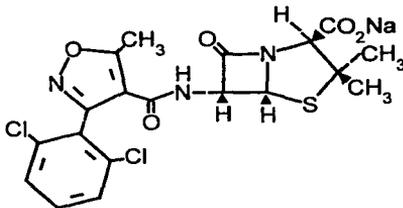


Figura 4. Estructura de la Dicloxacilina de sodio.

Nombre: Dicloxacilina de sodio.

Formula: $C_{19}H_{16}Cl_2N_3NaO_5S \cdot H_2O$

P.M. 510.32

$C_{19}H_{16}Cl_2N_3NaO_5S$

P.M. 492.31

6-[[[3-(2,6-Diclorofenil)-5-metil-4-isoxazolil]carbonil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxilato de sodio

4.1.2. Propiedades Físico químicas.

Tiene una potencia equivalente a no menos de 850 µg/mg de dicloxacilina base.

Sustancia de referencia: Dicloxacilina sódica. No secar antes de su uso.

Preparación: Se acila ácido 6-aminopenicilánico con ácido 3-(2,6-diclorogenil)-5-metil-4-isoxazolcarboxílico y la dicloxacilina (ácido) resultante se purifica mediante recristalización y se convierte en la sal sódica.

Descripción: Polvo cristalino blanco o blanco grisáceo, de tenue olor característico, que funde entre 222 y 225°C con descomposición; pH entre 4.5 y 7.5.

Solubilidad: Fácilmente soluble en agua y en alcohol.

Agua: El contenido de agua es entre 3.0 y 5.0 por ciento.

Conservación. En envases bien cerrados.

4.1.3. Ensayo de potencia del antibiótico:

Microorganismo de prueba: *Staphylococcus aureus*.

Temperatura de incubación en placas: 32-35°

Temperatura de incubación 36-37.5°

Secado del antibiótico: No.

Almacenamiento del antibiótico preparado: 7 días en refrigeración

Dosis media activa en µg o U/mL: 5.0 µg ^{27,28}

4.1.4. Características Farmacológicas.

Penicilina semisintética perteneciente al grupo de las penicilinas penicilinasarresistentes, ocupando el primer puesto de elección.

1. Modo de acción y espectro antibacteriano.

Su modo de acción es de tipo bactericida y es resistente a la penicilinas del estafilococo. Actúa en menor grado contra neumococo y estreptococo; con poca influencia contra el enterococo y con ninguna contra bacilos Gram negativos.

Su espectro antibacteriano se considera medio o reducido ya que no actúa contra bacterias Gram negativas, solamente contra bacterias Gram positivas, en específico contra *S. aureus* coagulasa positivo, productor de betalactamasa y contra algunos otros microorganismos cuya resistencia depende de la producción de esta enzima.

A esta penicilina semisintética se le caracteriza por ser la más efectiva de las penicilinas isoxazólicas o penicilinas resistentes para el tratamiento de infecciones por estafilococos en el humano, posee una marcada acción sinérgica con la ampicilina contra *Aerobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, especies de *Shigella*, *Pseudomonas pyocyaneas*, *E. coli*, *S. aureus* y *Streptococcus fecalis*. También inhibe la degradación de la ampicilina por la penicilinas aislada de *E. coli* y de *S. aureus* resistentes a la penicilina (Ej. Panac). Puede combinarse con cefalosporinas inyectables en sepsis estafilocócica grave por su similitud de núcleo químico y por ser elegible contra en mismo microorganismo. ^{3,28,29,30}

2. Absorción, difusión, excreción.

De las penicilinas penicilinas resistentes es la que mejor se absorbe por vía oral (entre 74 Y 80%); este antibiótico es estable en medio gástrico, con buena absorción en tracto intestinal mayor a la oxacilina y cloxacilina. La absorción

máxima es en ayunas o bien 1 a 2 horas después de los alimentos. La absorción aumenta en proporción a la cantidad suministrada logrando niveles sanguíneos altos y sostenidos. Pero la fijación a proteínas plasmáticas es muy fuerte, en una proporción del 95%, lo que promueve una lenta depuración renal y retarda la degradación por hígado. El alto grado de participación hepática en la farmacocinética del antibiótico lo restringe en pacientes con trastornos en este órgano y en neonatos. Su difusión hística y paso en la barrera meníngea son como los de la penicilina, pero este antibiótico es de peso molecular superior, por lo que causa menor filtración. Su volumen de distribución es de 0.1 mL/g y su vida media plasmática es de 0.5 a 1.5 hs en pacientes normales, pero más prolongada en la insuficiencia renal. Su excreción es vía renal, más o menos el 60% de la dicloxacilina se excreta por orina (siendo el transporte tubular el mecanismo más eficiente (90%)), cuando se mezcla con probencid la excreción se retarda, produciendo mayor concentración sanguínea.

3. Administración y dosis.

Este medicamento se administra en dosis media para adulto en 1 g por día, por vía oral repartido en tomas de 250 mg cada 6 hs; con un máximo de 4 tomas en día. En infantes se usa a razón de 25 mg por Kg de peso por día, con un máximo de 50 mg por Kg de peso por día. En casos de insuficiencia renal, la dosis se reduce al 50% alargando el tiempo de toma a cada 12 hs, no se ha establecido una dosis para neonatos. También es administrable por vía intramuscular, con solventes indoloros como la lidocaína; también se emplea por vía intravenosa por

goteo, o bien, directo a la venoclisis. Cabe mencionar que para cada tipo de administración el solvente indoloro varia.

4. Presentación.

La dicloxacilina puede encontrarse en presentaciones de cápsulas de 125, 250 y 500 mg, polvos para suspensión con 125 mg/5 mL, e inyectable de 500 mg, aunque ya existe de 250 para casos pediátricos.

5. Efectos tóxicos y colaterales.

Los efectos tóxicos y colaterales de la dicloxacilina son: 1) La hipersensibilidad a la penicilina excluye totalmente la indicación de la dicloxacilina porque tiene el mismo núcleo central químico, 2) Se han reportado depresiones transitorias de la médula ósea y nefrotoxicidad, infecciones cutáneas pero en menor frecuencia respecto a la ampicilina, 3) Su administración oral en terapias prolongadas produce las mismas molestias gastrointestinales leves (náuseas y diarrea) y eruptivas que la ampicilina, 4) En algunos pacientes aumenta la TGO sérica, hay casos raros de toxicidad hepática y en personas con baja tolerancia al sodio debe tomarse en cuenta el contenido de este en el antibiótico, 5) Se puede relacionar por vía parenteral con trastornos como la nefritis con cuadros clínicos típicos de fiebre, erupción cutánea, urticarias, eosinofilia, hematuria, proteinuria y en ocasiones grados variables de insuficiencia renal en tratamientos largos con el antibiótico. Estas lesiones son recuperables, pero en pacientes con estas

reacciones al recibir otra vez el fármacos puede presentar un nuevo cuadro clínico incluso con mayor exacerbación. ^{3, 28, 29, 31}

4.2 Ampicilina.

4.2.1. Nombre, estructura y fórmula química.

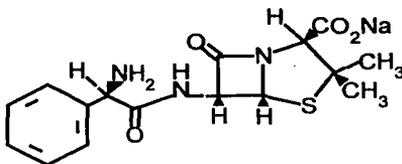


Figura 5. Estructura de la Ampicilina sódica.

Nombre: Ampicilina sódica.

Fórmula: $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$

P.M. 371.39

$C_{16}H_{19}N_3O_4S$

P.M. 349.40

6-[(R)-2-Amino-2fenilacetamido]-(2S,5R,6R)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxilato de sodio.

4.2.2. Propiedades Físico químicas.

Es la sal sódica cristalina del D(-)amino bencilpenicilina. No contiene menos del 845 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y no más de 988 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ampicilina, calculado con referencia a la sustancia seca.

Sustancia de referencia: Ampicilina. No secar. Ampicilina sódica.

Preparación: Se disuelve ampicilina en un disolvente orgánico apropiado y se precipita como sal sódica mediante adición de acetato de sodio.

La ampicilina se prepara normalmente cuando se acila ácido 6-aminopenicilánico con D-(-)-glicina, y presenta diversas formas hidratadas, el monohidrato que forma cristales incoloros en agua y descompone a 202 °C, el sesquihidrato que descompone a 199-202°C y el trihidrato que forma cristales incoloros que descompone a 200-202°C. Su forma anhidra (ampicilina B) es más estable al almacenaje, menos soluble al agua, con estructura cristalina diferente a las formas hidratadas, al hidratarse se convierte en monohidrato. La ampicilina es estable en medio ácido.

Descripción: Polvo cristalino blanco o blancuzco muy higroscópico, prácticamente inodoro, puede encontrarse como trihidrato, estable a temperatura ambiente. pH: entre 8 y 10.

Solubilidad: Muy soluble en agua y soluciones isotónicas de glucosa y cloruro de sodio; ligeramente soluble en acetona y en cloroformo; insoluble en éter dietílico, parafina líquida y aceites fijos. (1 gramo en 90 mL de agua y 250 mL de alcohol absoluto)

Conservación: En envases bien cerrados.

4.2.3. Ensayo de potencia del antibiótico.

Microorganismo de prueba: *Micrococcus luteus*.

Temperatura de incubación en placas: 32-35°

Temperatura de incubación 36-37.5°

Secado del antibiótico: No.

Almacenamiento del antibiótico preparado: 7 días en refrigeración.

Dosis media activa en µg o U/mL: 0.1 µg ^{28,29,30}

4.2.4. Características farmacológicas.

Penicilina semisintética perteneciente al grupo de las aminopenicilinas o penicilinas de amplio espectro.

1. Modo de acción y espectro antibacteriano.

La ampicilina es un derivado penicilínico capaz de actuar contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Esta condición la hace una droga de amplio espectro. Sin embargo existen bacterias Gram positivas como el estreptococo y el neumococo que son sensibles a la penicilina, y en grado menor a la ampicilina dándole desventajas a este antibiótico. Otros microorganismos Gram positivos como el enterococo y el estreptococo anaerobio o *Peptostreptococcus* presentes en enfermedades graves como la sepsis postaborto, son más sensibles a la ampicilina que a otros antibióticos.

La ampicilina (así como la penicilina) no actúa contra el estafilococo coagulasa positiva que porta la enzima penicilinas (la cual destruye el anillo betalactámico de su núcleo químico).

La ampicilina como se ha dicho actúa contra los bacilos Gram negativos lo que le da ventajas y limitaciones. Tiene una notable capacidad contra el *H. influenzae*,

considerándose fármaco electivo reemplazante del cloranfenicol en las infecciones a infantes, sin embargo han surgido cepas resistentes.

En el tratamiento de la fiebre tifoidea a pesar de la sensibilidad de la *S. typhi* no se le toma como fármaco de elección, por razones de función anatómica en la ubicación de la bacteria siendo preferible el cloranfenicol en estructuras linfáticas. Algunas cepas de *E. coli* son tratadas con ampicilina, sin embargo existen en esta familia cepas secretoras de penicilinasas resistentes al antibiótico.

Otros bacilos Gram negativos marginados del espectro de acción de la ampicilina son *Ps. aeruginosa*, *Klebsiella* y *Aerobacter aerogenes*. El *P. mirabilis* y el *P. Vulgaris* son sensibles a la ampicilina pero no los otros tipos de *Proteus*. La *Brucella* es sensible en dosis apropiadas.

Otros cocos Gram negativos como gonococo y meningococo, caen en la esfera de acción de la ampicilina en un modo eficaz similar al de la penicilina y superior en algunas de estas cepas. Los anaerobios como *Clostridium*, *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* también son más sensibles a la ampicilina.

La actividad de la ampicilina es bactericida y consiste en impedir la formación de pared celular de los microorganismos en fase de reproducción causando bacteriólisis, esta cualidad es de importancia en la terapia infectológica.

En veterinaria se ha utilizado contra estafilococos, estreptococos, *E. coli* y otros organismos patógenos.

2. Absorción, difusión y excreción.

La ampicilina es estable en medio ácido gástrico, por lo que puede administrarse por vía oral (absorción de un 40%) con resultados satisfactorios, obteniéndose el nivel sanguíneo terapéutico 2 horas después de la ingesta del antibiótico.

Posee fijación discreta a las proteínas plasmáticas (del 8 al 20%), la biodisponibilidad depende de la dosis y su volumen de distribución es de 0.17 a 0.31 mL/g y su vida media plasmática es de 0.5 a 1.0 hs, pero puede durar hasta 20 hs en la insuficiencia renal. Su eliminación es por orina en forma activa, excretándose cerca del 45% del antibiótico en forma intacta, hecho importante para terapias de enfermedades de vías urinarias. Su tiempo de eliminación tarda de 6 a 7 horas (tiempo superior a la penicilina).

Por vía biliar se elimina una buena parte, pero debe estar permeable. No debe esperarse efecto terapéutico local si hay obstrucción. Se difunde por pleura y articulaciones. Pasa la barrera meníngea y llega al líquido cefalorraquídeo en cantidades suficientes para el tratamiento de meningitis purulenta si la posología es la adecuada. La dosis debe ser óptima, administrada a intervalos regulares y mantenida largo tiempo.

El tiempo de eliminación de la ampicilina en los lactantes es menor comparado con niños y adultos por lo que el intervalo de la dosis debe ser mayor. En prematuros y neonatos por inmadurez renal, se prolonga el tiempo de vida media de la ampicilina.

3. Administración y dosis.

El modo usual de administración es por vía oral en dosis de 1 a 2 gramos por día en el adulto, repartido en tomas cada 6 horas. En niños se emplean de 25 a 50 mg/kg/día.

Las vías intramuscular e intravenosa se utilizan según la necesidad de la infección. El margen terapéutico es amplio y pueden indicarse 3, 4, 5 o 6 g en el adulto y hasta 250 mg/kg/día en el niño cuando se tratan enfermedades severas y graves como septicemias y meningitis bacteriana. En lactantes se emplean dosis mayores: 300-400 mg/kg/día.

La vía intra lumbar es posible y necesaria en pocas circunstancias, pero si se decide su empleo la dosis es pequeña: 20 mg para colmar a las meninges en el inicio del tratamiento de la meningitis. En pediatría 3 a 5 mg

El uso de la vía intravenosa reiterada provoca flebitis al cabo de pocos días, por lo que es necesario cambiar el sitio de la venoclisis. La aplicación por el habón (elevación cutánea aplanada a veces pruriginosa) a intervalos regulares es mejor, a los fines terapéuticos que el goteo continuo, porque se obtienen niveles sanguíneos más altos, y, por lo tanto el antibiótico es más efectivo.

Por otra parte se debe observar que las soluciones glucosadas inactivan la ampicilina en por cientos según el tiempo de contacto, y con menor intensidad lo hacen las soluciones de suero fisiológico.

La ampicilina potásica puede administrarse 1 hora antes o después de las comidas alcanzando elevada concentración sérica. Tiene la particularidad de administrarse

cada 12 horas en dosis de 500 mg cada una. En el niño la dosis es de 125 mg/kg/día repartido también en 2 tomas.

4. Presentación.

La ampicilina puede encontrarse en presentaciones de cápsulas de 250 y 500 mg, polvo para suspensión con 125 y 250 mg/5 mL, frasco ampola con 500 mg y 1.0 g para aplicación intramuscular o intravenosa.

5. Efectos tóxicos y colaterales.

La tolerancia al uso de la ampicilina es buena ya que da con escasa frecuencia reacciones adversas y de poco significado clínico como meteorismo, diarreas y náuseas observables en una administración por vía oral prolongada. Estudios recientes muestran que la ampicilina puede ser causante de la colitis por antibióticos.

La hipersensibilidad a la penicilina excluye totalmente la indicación de la ampicilina porque tiene el mismo núcleo central químico. Esta característica puede confundir al médico al considerar en algunos anuncios publicitarios a la ampicilina como un antibiótico nuevo y diferente a la penicilina.

La prescripción de ampicilina a los enfermos de mononucleosis infecciosa provoca erupción dérmica al 90% de los casos. El exantema es morbiliforme o escarlatiniforme, con evolución de una semana aproximadamente. La reacción se debe a los trastornos inmunológicos causados por el virus de la mononucleosis,

con la particularidad de observarse también en otros antibióticos pero de forma reducida excluyéndose como efecto alérgico.^{3,28,29,30,31}

4.3 AMOXACILINA.

4.3.1. Nombre, estructura y fórmula química.

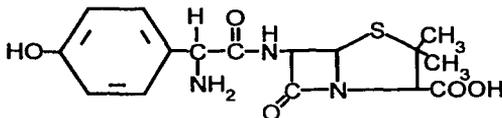


Figura 6. Estructura de la amoxicilina.

Nombre: Amoxicilina. (parahidroxiampicilina o aminopenicilina)

Fórmula: C₁₆H₁₉N₃O₅S P.M. 365.4

C₁₆H₁₉N₃O₅S.3H₂O P.M. 419.45

Ácido [2S-[2α,5α, 6β(S*)]]-6-[[amino(4-hidroxifenil)-acetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabiclo[3,2,0]heptano-2-carboxílico; D(-)-α-amino-p-hidroxibencilpenicilina.

4.3.2. Propiedades físico químicas.

Preparación: Mediante la acilación del ácido 6-aminopenicilánico con D(-)-2-(p-hidroxifenil) glicina.

Descripción: Fino polvo cristalino blanco a blancuzco de sabor amargo, que se altera con la humedad y temperatura mayor a 37° C.

Solubilidad: Un gramo en 370 mL de agua y 2000 mL de alcohol.

Conservación: En envases bien cerrados.

4.3.3. Ensayo de potencia del antibiótico.

La amoxicilina puede ensayarse por el método del pocillo, utilizando como organismo de prueba *Bacillus subtilis* o *Sarcina lutea* (*Micrococcus luteus*), o bien utilizando el método de ensayo de superposición con *Streptococcus hemolyticus* S-8 o *Bacillus subtilis*.^{2,28,30}

4.3.4. Características farmacológicas.

Penicilina semisintética perteneciente al grupo de las penicilinas de las aminopenicilinas o penicilinas de amplio espectro.

1. Modo de acción y espectro antibacteriano.

La amoxicilina tiene una estructura y espectro antimicrobiano similar al de la ampicilina, normalmente se emplea como sal sódica y es efectiva in vivo como in vitro contra bacterias Gram positivas y negativas.

Es una penicilina semisintética que tiene una estructura y espectro antimicrobiano similar a la ampicilina, su modo de acción es bactericida impidiendo la formación de pared celular en los microorganismos.

Su espectro comprende cocos Gram positivos como: neumococo, estreptococo y estafilococo, sin embargo se ve afectada por los secretores de penicilinasa. En el caso de los Gram negativos actúa ante meningococo y gonococo, también actúa contra bacilos Gram negativos como *E. Coli*, *H. Influenzae*, *P. vulgaris*, *B. Pertussis* y *S. sonnei*. No presenta acción contra *Ps. Aeruginosa*, Klebsiella, Enterobacter y Proteus indol positivo. También incluye en su espectro a algunas bacterias anaerobias como *Listeria monocytogenes* y algunas Leptospiras. Otras bacterias que pueden ser susceptibles son: Citrobacter, Diplococci, *Neisseria gonorrhoeae*, Pneumocci, Salmonella, *Staphylococcus aureus* (no productor de penicilinasa) y Shigella con baja actividad.

Ante la baja actividad que presenta el fármaco ante bacterias productoras de penicilinasa, se emplea en una mezcla con ácido clavulánico, el cual inhibe la acción de la betalactamasa y potencializa al antibiótico ante este tipo de bacterias, generalmente con las Gram negativas.

Se emplea en la prevención de la endocarditis bacteriana con una dosis de 2 g, así mismo se prevé la acción bacteriana una hora antes de la extracción dental; se emplea también como complemento en la prevención de la endocarditis por *Streptococcus viridians* posterior a la aplicación de la penicilina inyectable.

2. Absorción, difusión y excreción.

Este antibiótico presenta una muy buena absorción por vía oral (cerca del 100%), presentando en una dosis de 250 mg una concentración plasmática máxima de unos 4 µg/mL. También presenta muy buena absorción intestinal ya que no es

afectada por las comidas y por su ácido resistencia que le da mayor estabilidad en medio ácido que la ampicilina. Alcanza niveles elevados en sangre con poca fijación a proteínas plasmáticas (el 17% de la amoxicilina se fija a estas proteínas); su volumen de distribución es de 0.4 mL/g, su vida media es de aproximadamente 1.0 hs cuando la función renal es normal y de 7 a 10 hs en la insuficiencia renal. Tras la administración oral en ratas los niveles sanguíneos y cutáneos son más elevados que los vistos con la administración de penicilina, la concentración máxima en suero normalmente se alcanza a las 2 hs después de la administración oral.

Su eliminación es por vía renal (del 50 al 75% se elimina mediante secreción tubular), y conserva su actividad terapéutica por lo que puede actuar como preventivo ante infecciones de vías urinarias, sin embargo en caso de infecciones en este tracto se emplean dosis únicas de 3 g.

3. Administración y dosis.

Para el tratamiento generalmente se administra en forma oral, aconsejándose dosis de 1.5 mg por día en el adulto repartidos en tomas cada 8 hs, sin embargo según el criterio del médico pueden emplearse dosis hasta de 4, 6 y 8 g por día dependiendo del tipo de infección. Las dosis pediátricas van de 35 a 75 mg por Kg de peso y por día. Para la gonorrea 3 g en una sola dosis junto con 1 g de probenecid.

4. Presentación.

La amoxicilina puede encontrarse en presentaciones de cápsulas de 250 y 500 mg, polvo para suspensión oral de 50 mg/mL y 125 y 250 mg/5 mL, comprimidos masticables de 125 y 150 mg y frasco ampola para inyectable de 250 y 500 mg.

5. Efectos tóxicos y colaterales.

La amoxicilina presenta una buena tolerancia empleándose en tratamientos prolongados, tanto en adultos como en lactantes y niños pequeños, con éxitos terapéuticos en infecciones respiratorias y urinarias, así como en la práctica médica general, la toxicidad del fármaco es similar a la de la ampicilina.

Este antibiótico presenta efectos secundarios poco comunes como la erupción maculopápulosa similar a la que se presenta en la reacción secundaria por ampicilina, pueden presentarse náuseas, molestias abdominales y diarrea (menor que con ampicilina), así como urticaria, anafilaxia y enfermedad del suero. La amoxicilina sódica presenta un contenido de sodio de 2.7 mEq/g por lo que debe manejarse con cautela en pacientes con baja tolerancia al sodio.^{3,28,30,31}

PROBLEMA A RESOLVER.

Los antibióticos como la dicloxacilina, la ampicilina y la amoxicilina son penicilinas semisintéticas de uso frecuente en el combate de enfermedades bacterianas en México. En los últimos años han surgido varios laboratorios que los producen y venden en su forma innovadora y bajo patentes vencidas, por lo que es necesario realizar una investigación que determine al método de dilución en tubo como tamiz en la evaluación y comparación de antibióticos con el mismo principio activo pero elaborados por diferentes laboratorios, para observar sus diferencias en cuanto a su sensibilidad microbiológica.

OBJETIVOS.

General:

- Analizar muestras de penicilinas semisintéticas (dicloxacilina, ampicilina y amoxicilina) en polvo inyectable por el método de dilución en tubo propuesto. de tres fabricantes diferentes para cada una de ellas.

Específicos:

- Determinar la CIM y la CBM de los antibióticos empleados.
- Comparar la similitud de CIM y CBM de cada antibiótico entre sus diferentes productores.
- Determinar si el método empleado es sencillo en la evaluación y comparación de antibióticos con el mismo principio activo de diferentes laboratorios.

HIPÓTESIS.

Se espera que el método de dilución en tubo al determinarse la CIM y la CBM; sea capaz de encontrar diferencias entre dos penicilinas semisintéticas cuando estas no tienen una sensibilidad o efecto microbiológica similar.

DISEÑO DE INVESTIGACION.

a) *Tipo de estudio:* Experimental, Prospectivo, transversal, comparativo.²⁶

b) *Población de estudio:* Penicilinas semisintéticas como: dicloxacilinas, ampicilinas y amoxicilinas de uso y distribución común, en la presentación de polvo inyectable de 500 mg, en sales sódicas de tres laboratorios productores diferentes para cada antibiótico.

c) *Criterios de inclusión.*

- Ser antibióticos en la forma de polvo inyectable.
- Estar en una presentación de 500 mg del antibiótico.
- Deberán ser solubles en agua destilada y en solución salina 0.9%
- Deberán ser antibióticos en sales sódicas.
- Ser penicilinas con el mismo principio activo de 3 laboratorios diferentes.

d) *Criterios de exclusión:*

- Ser antibióticos en formas diferentes al polvo inyectable.
- Estar en presentaciones diferentes a los 500 mg del antibiótico.
- Ser insolubles en agua destilada y en solución salina 0.9%.
- Ser antibióticos en sales no sódicas.
- Ser antibióticos diferentes a las penicilinas empleadas.
- Ser antibióticos en sales puras.

e) Criterios de eliminación.

- Que los viales donde están contenidos los antibióticos se encuentren violados o en mal estado afectando las sales.
- Que las sales de los antibióticos presenten alteraciones físicas en cuanto a su estado, color o bien que se encuentren húmedas.
- Que la fecha de caducidad de las muestras estén vencidas o a dos mes de su fecha limite de caducidad.

VARIABLES.

a) Variables Independientes:

- Los diferentes laboratorios productores de los antibióticos empleados.
- Los rangos de concentración según el antibiótico y microorganismos de prueba.

b) Variables Dependientes:

- La Concentración Inhibitoria Mínima y la Concentración Bactericida Mínima.
- Las lecturas de turbidez y % de transmitancia.

DISEÑO ESTADÍSTICO.

Se realizara el análisis por regresión lineal entre antibióticos de igual principio activo y de diferentes laboratorios, empleando el programa SPSS ver. 9 y se elaboraran gráficas de % de transmitancia contra logaritmo de la concentración de los antibióticos de los triplicados.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

MATERIAL.

Tubos de ensaye con tapa de rosca 13X100	Kimax
Tubos de ensaye con tapa de rosca 18X150	Pyrex
Tubos de ensaye 13X100	Pyrex
Tubos de ensaye 18X150	Pyrex
Cajas Petri desechables 60 X 15 mm	S y L, Laboratorios
Cajas Petri de cristal 90 X 15 mm	Kimax, Pyrex
Pipetas Pateur	
Bulbo para pipeta Pasteur	
Pipetas graduadas de 0.1, 1, 2, 5, y 10 mL	Pyrex
Matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapa de rosca	Pyrex
Pipeta semiautomática de 100 μ L	Labsen Scientific Company
Pipeta semiautomática graduable de 10 a 100 μ L	Labsen Scientific Company
Puntas plásticas para pipeta semiautomática (100 μ L)	
Caja plástica para puntas de pipeta semiautomática esterilizable.	
Gradillas de metal	
Porta filtro esterilizable para membrana millipore de 25 mm	Gelman Sciences
Membranas millipore de 25 mm y poro de 0.22 micras.	Millipore
Jeringas desechables de 10 y 20 mL	Medicraft, Plastipack
Mechero Fischer	
Espátulas de acero inoxidable	
Celdas para espectrofotómetro.	
Porta objetos y cubreobjetos	Corning
Perilla de hule	
Algodón y gasa	
Material de esterilización (papel, cinta adhesiva y testigo)	

EQUIPO.

Incubadora	Rlossa
Agitador para tubos de ensaye	Vortex – Genie
Espectrofotómetro U.V. / Visible	Perkin – Elmer
Balanza Analítica	Mettler H80
Balanza Granataria	Ohaus
Olla Express con barómetro	Steele
Contador de colonias	Solbat
Microscopio	Zeiss
Refrigerador	Philips

REACTIVOS.

Peptona.
Digerido pancreático de caseína
Extracto de levadura
Extracto de carne
Dextrosa
Agar
Agua destilada
Formaldehído
Ácido Sulfúrico
Benzal
Sulfato de Bario
Dicloxacilina sódica polvo inyectable 500 mg
Ampicilina sódica polvo inyectable 500 mg
Amoxicilina sódica polvo inyectable 500 mg

SOLUCIONES.

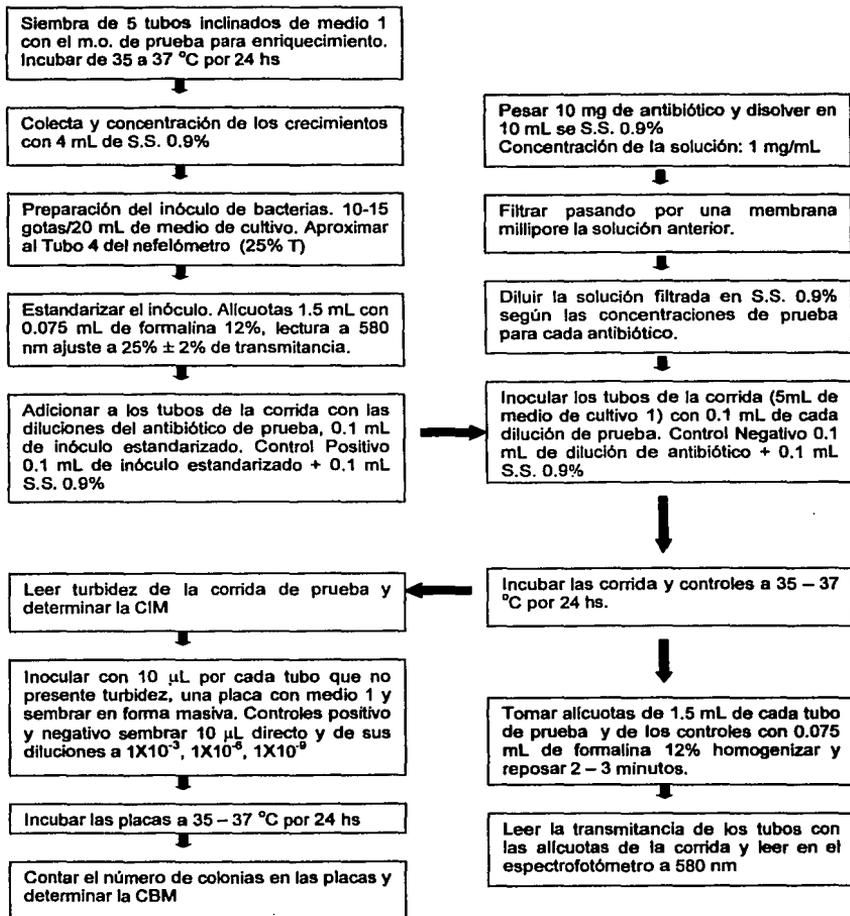
Solución salina isotónica

Bioxon
Merck
Bioxon
Bioxon
Merck
Dibico

Baker
Baker
Benzal
Baker
Brispen, Posipen, Ditterolina
Pentrexil, Binotal, Flamicina
Amoxil, Penamox.

PISA

DIAGRAMA DE FLUJO.



MÉTODOS.

I. Preparación de la solución concentrada de bacterias.

a) Se realiza la resiembra de la cepa bacteriana a emplear en medio de cultivo No. 1 para obtener un crecimiento enriquecido en tubos inclinados, empleando de 4 a 6 tubos estériles, estos se incuban a temperatura de 32 a 35 ° C por 24 hs, o bien a la temperatura adecuada para el crecimiento de la bacteria inoculada.

b) Después de la incubación se cosecha el crecimiento obtenido con solución salina estéril al 0.9%, colocando 4 mL de la solución en un tubo con crecimiento, con estos 4 mL se lava la superficie del agar con ayuda de una pipeta Pasteur estéril por medio de succión y expulsión de la solución, una vez suspendido el crecimiento en la solución se transvasa con la pipeta Pasteur a un segundo tubo, y así sucesivamente en los restantes, concentrando la solución, del último tubo en el que se realizan los lavados se traspara la solución final concentrada a un tubo con tapa de rosca estéril.

II. Preparación del inóculo bacteriano.

a) Preparación del blanco: Este se prepara colocando en un tubo de ensaye 18X150 con tapa de rosca 9 mL de medio de cultivo líquido No. 1 estéril, 1 mL de solución salina estéril al 0.9% y 0.5 mL de formalina la 12%. (Este puede conservarse por dos días en refrigeración.)

b) Preparación del inóculo: En un tubo de ensaye con tapa de rosca de 18X150 con 20 mL de medio de cultivo líquido No. 1 estéril, se colocan con una pipeta Pasteur aproximadamente 10 a 15 gotas de la solución concentrada de bacterias

de 24 hs y se agita fuertemente hasta homogenizar el contenido. La cantidad de gotas de la solución concentrada va de acuerdo a la turbidez del contenido del tubo, la cual se debe ajustar aproximadamente al tubo No. 4 del nefelómetro de Mac Farlan con una transmitancia cercana al 25%.

III. Estandarización del inóculo:

a) Ajuste: Se ajusta el espectrofotómetro en transmitancia a una longitud de onda de 580 nm en aire al 0% de transmitancia. Se ajusta nuevamente el espectrofotómetro con el blanco a la misma longitud de onda al 100% de transmitancia.

b) Estandarización del inóculo: Se toma una alícuota de 1.5 mL del tubo con medio de cultivo y bacterias a estandarizar y se coloca en un tubo de ensaye de 13X100, se agregan 0.075 mL de formalina al 12%, se agita y se deja reposar de 1 a 2 min., se traspa el contenido del tubo a una celda para espectrofotómetro y se lee en el aparato la transmitancia del medio con bacterias. Dependiendo de la lectura de transmitancia obtenida se agrega medio de cultivo o solución concentrada de bacterias al tubo a estandarizar hasta obtener una lectura de transmitancia de 25% \pm 2% leyéndose individualmente cada aproximación y repitiendo los pasos anteriores de la inactivación con formalina al 12%.

c) El inóculo estandarizado puede conservarse en refrigeración mientras se preparan las diluciones de los antibióticos a emplearse.

IV. Preparación de las diluciones de antibiótico.

a) Se destapa un vial de antibiótico retirando el sello de metal y el tapón de goma del frasco, después se pesan aproximadamente 10 mg del antibiótico y se depositan en un tubo de ensaye con tapa de rosca estéril cerca del mechero, se le adicionan 10 mL de solución salina 0.9% estéril disolviendo el antibiótico por medio de agitación. Quedando una solución de concentración de 1 mg/mL

b) La solución de concentración de 1 mg/mL es tomada con una jeringa de 10 mL estéril y se filtra pasándola por un porta filtro estéril con membrana millipore de 25 mm y 0.22 micras, el filtrado se recibe al otro lado del porta filtro en un tubo con tapa de rosca estéril.

c) Con la solución anterior se realizan diluciones de esta ajustando a las concentraciones que se requieran para cada antibiótico y cepa de bacterias, empleando solución salina estéril al 0.9%, los volúmenes finales de las diluciones de antibióticos son de 10mL.

V. Inoculación de los tubos de prueba con el inóculo bacteriano estandarizado y las diluciones de antibiótico.

a) Se colocan en una gradilla tubos de ensaye con 5 mL de medio de cultivo líquido No. 1 estéril como lo indica la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para probar cada antibiótico, y dos más para los controles positivo y negativo.

b) Cerca del mechero Fischer se colocan con una pipeta semiautomática 0.1 mL de cada dilución del antibiótico a probar en los tubos con medio de cultivo estéril

de acuerdo a su etiqueta y su concentración en la corrida de prueba y al control negativo, al cual también se adicionan 0.1 mL de solución salina estéril al 0.9%.

c) A los tubos ya inoculados con las diluciones de los antibióticos se agregan 0.1 mL de inóculo de bacterias estandarizado por cada tubo de la corrida de prueba y al control positivo, al cual también se adiciona 0.1 mL de solución salina.

d) Los tubos inoculados tanto con los antibióticos como con el inóculo estandarizado de bacterias se homogenizan por agitación y se colocan en las gradillas para ser incubados de 35-37°C por 24 hs.

e) Las diluciones de los antibióticos y la solución concentrada de bacterias puede guardarse en refrigeración hasta 7 días o bien dependiendo de la estabilidad de cada antibiótico. (Las corridas de prueba se realizan por triplicado)

VI. Lectura de la Turbidez.

a) Después de incubar las corridas de prueba, estas se leen utilizando una línea negra como fondo o bien el paso de la luz a través de cada tubo observándose si el crecimiento deja pasar o ver bien la línea claramente, ligeramente o que no se observe ni la línea ni el paso de luz, considerándose respectivamente como sin turbidez, ligeramente turbio y turbio los resultados obtenidos de la observación.

b) Con los resultados obtenidos se determina la Concentración Inhibitoria Mínima en las corridas de prueba siendo esta la concentración del tubo siguiente al último tubo que presente ligera turbidez o bien el primer tubo claro de la corrida.

VII. Siembra de placas para cada corrida de prueba.

- a) Se etiquetan placas desechables con medio de cultivo No. 1 estéril que cubran los tubos que no presentan turbidez visible de la corrida de antibióticos.
- b) Se inocula cada placa con 10 μL de suspensión de cada tubo sin turbidez y se extiende el inóculo por siembra masiva en la superficie de la placa.
- c) Los controles positivo y negativo se siembran de igual manera al paso anterior. Al control positivo se le realizan diluciones seriadas en solución salina al 0.9% colocando 0.1 mL en un tubo y diluyéndolo en 9.9 mL de solución salina, de este tubo se toman 0.1 mL y se colocan en otro tubo con 9.9 mL de solución salina, de este segundo tubo se vuelven a tomar 0.1 mL y se colocan en un tercer tubo con 9.9 mL de solución salina quedando las diluciones del control positivo respectivamente de 1×10^{-3} , 1×10^{-6} Y 1×10^{-9} .
- d) De las diluciones del control positivo se toman respectivamente 10 μL y se siembran masivamente en sus respectivas placas de medio de cultivo estéril.
- e) Las placas ya inoculadas se incuban de 35-37 °C por 24 hs (Las siembras se realizan también por triplicado de a cuerdo a cada corrida de prueba)

VIII. Análisis Espectrofotométrico.

- a) De acuerdo al número de tubos de cada corrida, se preparan tubos de ensaye 13x100 con 0.075 mL de formalina al 12%, tomando en cuenta también los controles positivo y negativo, etiquetando cada tubo según corresponda a la dilución de antibiótico.

b) Se toman alícuotas de 1.5 mL de cada tubo de las corridas de prueba y se van colocando en su respectivo tubo de ensaye con formalina al 12%, se agita cada tubo y se deja reposar de 2 a 3 minutos, para posteriormente leer la transmitancia en el espectrofotómetro ajustado con el blanco a 580 nm, al 100% de transmitancia y se leen respectivamente cada corrida de prueba junto con sus controles.²⁷

RESULTADOS.

A) Dicloxacilinas.

Microorganismo: <i>S. aureus</i>	% T. Inóculo estandarizado: 24.9
Dicloxacilina 1	

Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	3.9	Incontable	-
12	Turbio	3	84.9	Incontable	-
14	Turbio	3	95.5	Incontable	-
16	Turbio	3	97.5	Incontable	-
18	Turbio	3	97.2	Incontable	-
20	Lig. Turbio	2	97.3	Incontable	-
24	Lig. Turbio	2	97.0	Incontable	-
26	Negativo	1	99.0	Incontable	-
32	Negativo	1	99.3	Incontable	-
36	Negativo	1	100.6	90	9000
40	Negativo	1	100.0	47	4700
Control (-)	Negativo	1	103.2	Negativo	
Control (+)	Turbio	3	3.9	Incontable	
C+ 1X10 ⁶				Incontable	
C+ 1X10 ⁸				66	
C+ 1X10 ⁹				7	

Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	3.7	Incontable	-
12	Turbio	3	83.0	Incontable	-
14	Turbio	3	97.5	Incontable	-
16	Turbio	3	97.5	Incontable	-
18	Turbio	3	99.3	Incontable	-
20	Lig. Turbio	2	97.6	Incontable	-
24	Lig. Turbio	2	96.4	Incontable	-
26	Negativo	1	99.3	Incontable	-
32	Negativo	1	99.7	Incontable	-
36	Negativo	1	98.9	117	11700
40	Negativo	1	99.4	53	5300
Control (-)	Negativo	1	103.0	Negativo	
Control (+)	Turbio	3	3.7	Incontable	
C+ 1X10 ⁶				Incontable	
C+ 1X10 ⁸				61	
C+ 1X10 ⁹				5	

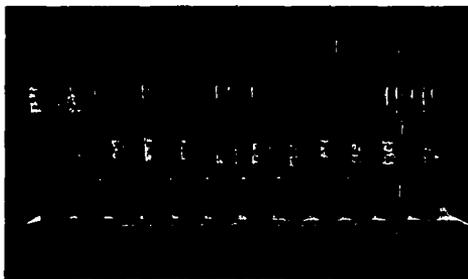
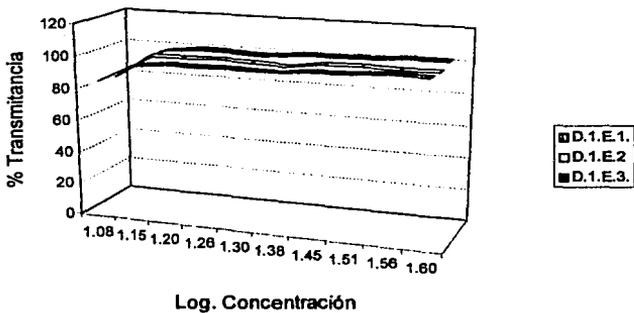
Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	4.3	Incontable	-
12	Turbio	3	86.1	Incontable	-
14	Turbio	3	97.2	Incontable	-
16	Turbio	3	99.3	Incontable	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

18	Turbio	3	98.8	Incontable	-
20	Liq. Turbio	2	97.8	Incontable	-
24	Liq. Turbio	2	99.8	Incontable	-
28	Negativo	1	99.9	Incontable	-
32	Negativo	1	100.3	Incontable	-
36	Negativo	1	101.7	104	10400
40	Negativo	1	101.3	44	4400
Control (-)	Negativo	1	104.1	Negativo	
Control (+)	Turbio	3	4.3	Incontable	
C+ 1X10 ⁷				Incontable	
C+ 1X10 ⁸				58	
C+ 1X10 ⁹				8	



Dicloxacilina 1



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Corrida Dicloxacilina 1.

Microorganismo: *S. aureus*
Dioxacilina 2

% T. Inóculo estandarizado: 24.0

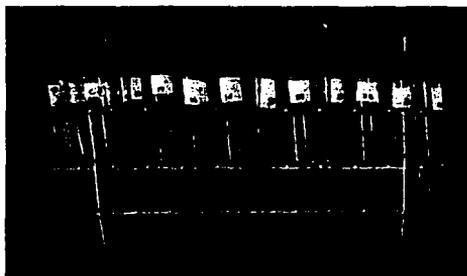
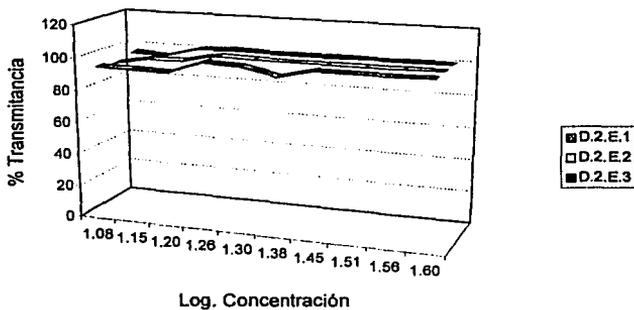
Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	4.6	Incontable	-
12	Turbio	3	94.3	Incontable	-
14	Turbio	3	93.8	Incontable	-
16	Turbio	3	93.5	Incontable	-
18	Turbio	3	101.0	Incontable	-
20	Lig. Turbio	2	100.0	Incontable	-
24	Negativo	1	95.5	Incontable	-
28	Negativo	1	100.1	Incontable	-
32	Negativo	1	100.0	Incontable	-
36	Negativo	1	99.9	11	1100
40	Negativo	1	100.3	14	1400
Control (-)	Negativo		100.4	Negativo	
Control (+)	Turbio		4.6	Incontable	
C+ 1X10 ⁶				Incontable	
C+ 1X10 ⁵				31	
C+ 1X10 ⁴				5	
C+ 1X10 ³				3	
C+ 1X10 ²				3	
C+ 1X10 ¹				3	

Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	4.9	Incontable	-
12	Turbio	3	92.8	Incontable	-
14	Turbio	3	96.5	Incontable	-
16	Turbio	3	96.8	Incontable	-
18	Turbio	3	101.2	Incontable	-
20	Lig. Turbio	2	100.0	Incontable	-
24	Negativo	1	100.1	Incontable	-
28	Negativo	1	100.1	Incontable	-
32	Negativo	1	100.1	Incontable	-
36	Negativo	1	100.2	15	1500
40	Negativo	1	100.3	22	2200
Control (-)	Negativo		100.5	Negativo	
Control (+)	Turbio		4.9	Incontable	
C+ 1X10 ⁶				Incontable	
C+ 1X10 ⁵				37	
C+ 1X10 ⁴				4	
C+ 1X10 ³				4	
C+ 1X10 ²				4	
C+ 1X10 ¹				4	

Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	5.3	Incontable	-
12	Turbio	3	95.6	Incontable	-
14	Turbio	3	94.9	Incontable	-
16	Turbio	3	100.0	Incontable	-
18	Turbio	3	101.0	Incontable	-
20	Lig. Turbio	2	100.1	Incontable	-
24	Negativo	1	100.1	Incontable	-
28	Negativo	1	100.2	Incontable	-
32	Negativo	1	100.2	Incontable	-

36	Negativo	1	100.1	10	1000
40	Negativo	1	100.2	19	1900
Control (-)	Negativo		100.5	Negativo	
Control (+)	Turbio		5.3	Incontable	
C+ 1X10 ⁻⁴				Incontable	
C+ 1X10 ⁻⁶				48	
				2	

Dicloxacilina 2



Corrida Dicloxacilina 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microorganismo: <i>S. aureus</i>	% T. Inóculo estandarizado: 24.0
Dicloxacilina 3	

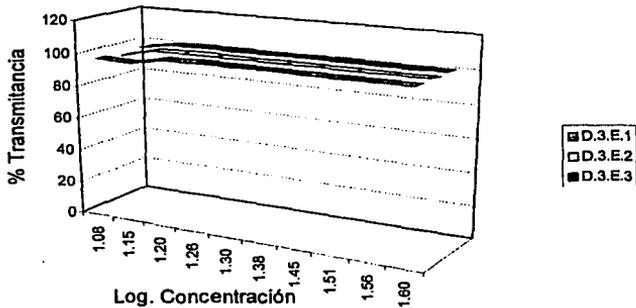
Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	4.9	Incontable	-
12	Turbio	3	96.7	Incontable	-
14	Turbio	3	96.0	Incontable	-
16	Turbio	3	100.1	Incontable	-
18	Turbio	3	100.2	Incontable	-
20	Turbio	3	100.3	Incontable	-
24	Turbio	3	100.4	Incontable	-
28	Lig. Turbio	2	100.3	Incontable	-
32	Negativo	1	100.3	Incontable	-
36	Negativo	1	100.4	67	6700
40	Negativo	1	100.5	40	4000
Control (-)	Negativo	1	100.6	Negativo	
Control (+)	Turbio	3	4.9	Incontable	
C+ 1X10 ⁷				Incontable	
C+ 1X10 ⁶				170	
C+ 1X10 ⁵				8	
C+ 1X10 ⁴					

Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	4.3	Incontable	-
12	Turbio	3	95.1	Incontable	-
14	Turbio	3	99.9	Incontable	-
16	Turbio	3	100.5	Incontable	-
18	Turbio	3	100.3	Incontable	-
20	Turbio	3	100.3	Incontable	-
24	Turbio	3	100.4	Incontable	-
28	Lig. Turbio	2	100.4	Incontable	-
32	Negativo	1	100.3	Incontable	-
36	Negativo	1	100.4	62	6200
40	Negativo	1	100.5	36	3600
Control (-)	Negativo	1	100.7	Negativo	
Control (+)	Turbio	3	4.3	Incontable	
C+ 1X10 ⁷				Incontable	
C+ 1X10 ⁶				138	
C+ 1X10 ⁵				9	
C+ 1X10 ⁴					

Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	4.3	Incontable	-
12	Turbio	3	97.0	Incontable	-
14	Turbio	3	100.0	Incontable	-
16	Turbio	3	100.5	Incontable	-
18	Turbio	3	100.3	Incontable	-
20	Turbio	3	100.3	Incontable	-
24	Turbio	3	100.4	Incontable	-
28	Lig. Turbio	2	100.4	Incontable	-
32	Negativo	1	100.3	Incontable	-

36	Negativo	1	100.4	74	7400
40	Negativo	1	100.5	45	4500
Control (-)	Negativo	1	100.8	Negativo	
Control (+)	Turbio	3	4.3	Incontable	
C+ 1X10 ⁸				Incontable	
C+ 1X10 ⁶				156	
C+ 1X10 ⁴				6	

Dicloxacilina 3



Corrida Dicloxacilina 3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Ampicilinas.

Microorganismo: <i>M. luteus</i>	% T. Inóculo estandarizado: 26.0
Ampicilina 1	

Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	14.3	Incontable	-
0.5	Turbio	3	64.1	Incontable	-
1	Turbio	3	77.8	Incontable	-
1.5	Liq. Turbio	2	90.3	Incontable	-
2	Liq. Turbio	2	96.4	Incontable	-
2.5	Negativo	1	99.8	81	8100
3	Negativo	1	99.9	79	7900
3.5	Negativo	1	100.0	62	6200
4	Negativo	1	100.0	56	5600
4.5	Negativo	1	100.1	46	4600
5	Negativo	1	100.0	43	4300
5.5	Negativo	1	100.0	30	3000
6	Negativo	1	100.1	26	2600
6.5	Negativo	1	100.1	21	2100
7	Negativo	1	100.2	18	1800
7.5	Negativo	1	100.2	10	1000
8	Negativo	1	100.1	13	1300
8.5	Negativo	1	100.1	11	1100
9	Negativo	1	100.1	16	1600
9.5	Negativo	1	100.1	13	1300
10	Negativo	1	100.5	11	1100
CONTROL (-)	Negativo		100.7	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		14.3	Incontable	
C+ 1X10 ⁸				Incontable	
C+ 1X10 ⁶				47	
C+ 1X10 ⁴				2	
					µg/ml
					CIM = 2.6
					CBM = 3.6

Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	13.1	Incontable	-
0.5	Turbio	3	67.3	Incontable	-
1	Turbio	3	77.4	Incontable	-
1.5	Liq. Turbio	2	88.2	Incontable	-
2	Liq. Turbio	2	97.0	Incontable	-
2.5	Negativo	1	100.0	86	8600
3	Negativo	1	99.5	82	8200
3.5	Negativo	1	100.0	60	6000
4	Negativo	1	100.2	58	5800
4.5	Negativo	1	100.1	50	5000
5	Negativo	1	100.1	44	4400
5.5	Negativo	1	100.1	32	3200
6	Negativo	1	100.0	24	2400
6.5	Negativo	1	100.1	23	2300
7	Negativo	1	100.2	15	1500
7.5	Negativo	1	100.1	12	1200
8	Negativo	1	99.9	10	1000
8.5	Negativo	1	100.1	19	1900
9	Negativo	1	100.1	15	1500
9.5	Negativo	1	100.1	15	1500
10	Negativo	1	101.1	13	1300

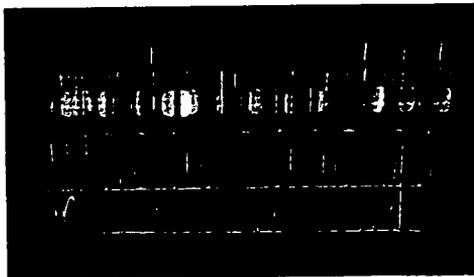
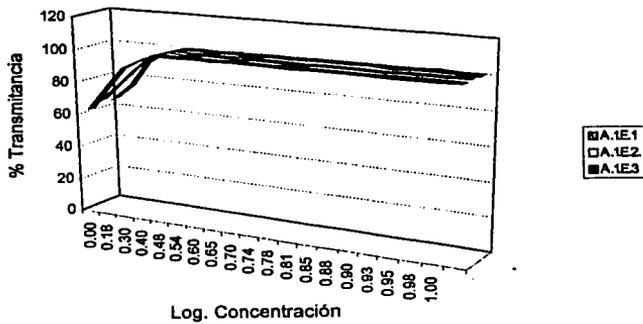
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTROL (-)	Negativo		100.7	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		13.1	Incontable	
C+ 1X10 ⁶				Incontable	
C+ 1X10 ⁵				43	
C+ 1X10 ⁴				4	

Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	10.0	Incontable	-
0.5	Turbio	3	65.8	Incontable	-
1	Turbio	3	75.2	Incontable	-
1.5	Lig. Turbio	2	90.3	Incontable	-
2	Lig. Turbio	2	98.4	Incontable	-
3	Negativo	1	99.8	84	8400
3.5	Negativo	1	99.9	81	8100
4	Negativo	1	100.0	84	8400
4.5	Negativo	1	100.0	57	5700
5	Negativo	1	100.0	43	4300
5.5	Negativo	1	100.1	39	3900
5.5	Negativo	1	100.1	36	3600
6	Negativo	1	100.2	22	2200
6.5	Negativo	1	100.0	29	2900
7	Negativo	1	100.1	20	2000
7.5	Negativo	1	100.3	14	1400
8	Negativo	1	100.1	17	1700
8.5	Negativo	1	100.1	15	1500
9	Negativo	1	100.4	10	1000
9.5	Negativo	1	100.1	17	1700
10	Negativo	1	100.3	15	1500
CONTROL (-)	Negativo		100.7	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		10.0	Incontable	
C+ 1X10 ⁶				Incontable	
C+ 1X10 ⁵				42	
C+ 1X10 ⁴				5	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ampicilina 1



Corrida Ampicilina 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microorganismo: <i>M. luteus</i>	% T. Inóculo estandarizado: 24.3
Ampicilina 2	

Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	20.7	Incontable	-
1	Turbio	3	77.8	Incontable	-
1.5	Liq. Turbio	2	94.0	131	13100
2	Negativo	1	95.5	86	8600
2.5	Negativo	1	98.4	84	8400
3	Negativo	1	98.9	60	6000
3.5	Negativo	1	99.2	56	5600
4	Negativo	1	99.8	40	4000
4.5	Negativo	1	100.5	31	3100
5	Negativo	1	100.2	29	2900
5.5	Negativo	1	100.5	24	2400
6	Negativo	1	101.3	27	2700
6.5	Negativo	1	100.4	27	2700
CONTROL (-)	Negativo		100.3	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		20.7	Incontable	
C ⁺ 1X10 ⁸				Incontable	
C ⁺ 1X10 ⁷				38	
C ⁺ 1X10 ⁶				1	
				µg/mL	2.0
				CFU	3.5

Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	17.7	Incontable	-
1	Turbio	3	76.2	Incontable	-
1.5	Liq. Turbio	2	95.5	110	11000
2	Negativo	1	97.1	86	8600
2.5	Negativo	1	97.7	106	10600
3	Negativo	1	99.2	72	7200
3.5	Negativo	1	99.0	67	6700
4	Negativo	1	99.5	32	3200
4.5	Negativo	1	99.5	26	2600
5	Negativo	1	100.5	26	2600
5.5	Negativo	1	100.7	27	2700
6	Negativo	1	99.9	31	3100
6.5	Negativo	1	100.5	29	2900
CONTROL (-)	Negativo		100.4	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		17.7	Incontable	
C ⁺ 1X10 ⁸				Incontable	
C ⁺ 1X10 ⁷				36	
C ⁺ 1X10 ⁶				2	

Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	17.5	Incontable	-
1	Turbio	3	76.8	Incontable	-
1.5	Liq. Turbio	2	93.0	117	11700
2	Negativo	1	96.8	93	9300
2.5	Negativo	1	98.3	77	7700

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microorganismo: <i>M. luteus</i>	% T. Inóculo estandarizado: 24.3
Ampicilina 3	

Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	20.7	Incontable	-
1	Turbio	3	89.9	Incontable	-
1.5	Lig. Turbio	2	98.5	Incontable	-
2	Lig. Turbio	2	100.6	146	14600
2.5	Lig. Turbio	2	100.6	139	13900
3	Negativo	1	100.9	91	9100
3.5	Negativo	1	100.9	87	8700
4	Negativo	1	100.9	53	5300
4.5	Negativo	1	101.1	67	6700
5	Negativo	1	101.1	53	5300
5.5	Negativo	1	101.1	60	6000
6	Negativo	1	101.1	47	4700
6.5	Negativo	1	101.1	57	5700
CONTROL (-)	Negativo	1	101.4	Negativo	-
CONTROL (+)	Turbio	3	20.7	Incontable	-
C+ 1X10 ⁸				Incontable	-
C+ 1X10 ⁶				38	-
C+ 1X10 ⁴				1	-

U.F.C./mL
CIM
3.0
CBM
4.0

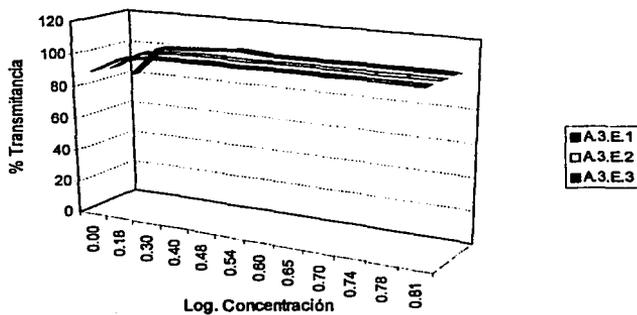
Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	17.7	Incontable	-
1	Turbio	3	88.9	Incontable	-
1.5	Lig. Turbio	2	99.0	Incontable	-
2	Lig. Turbio	2	100.7	119	11900
2.5	Lig. Turbio	2	100.8	120	12000
3	Negativo	1	100.9	104	10400
3.5	Negativo	1	100.6	82	8200
4	Negativo	1	101.0	66	6600
4.5	Negativo	1	101.1	71	7100
5	Negativo	1	100.9	68	6800
5.5	Negativo	1	100.8	72	7200
6	Negativo	1	101.1	50	5000
6.5	Negativo	1	101.0	63	6300
CONTROL (-)	Negativo	1	101.4	Negativo	-
CONTROL (+)	Turbio	3	17.7	Incontable	-
C+ 1X10 ⁸				Incontable	-
C+ 1X10 ⁶				36	-
C+ 1X10 ⁴				2	-

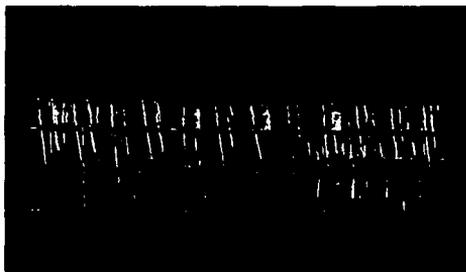
U.F.C./mL
CIM
3.0
CBM
4.0

Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	17.5	Incontable	-
1	Turbio	3	81.0	Incontable	-
1.5	Lig. Turbio	2	99.1	Incontable	-
2	Lig. Turbio	2	100.2	133	13300
2.5	Lig. Turbio	2	100.8	109	10900

			102.7	76	7600
3.5	Negativo	1	100.9	94	9400
4	Negativo	1	100.7	71	7100
4.5	Negativo	1	101.1	76	7600
5	Negativo	1	101.1	61	6100
5.5	Negativo	1	101.1	64	6400
6	Negativo	1	101.0	46	4600
6.5	Negativo	1	101.0	48	4800
CONTROL (-)	Negativo	1	101.4	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio	3	17.5	Incontable	
C+ 1X10 ²				Incontable	
C+ 1X10 ⁴				41	
C+ 1X10 ⁶				0	
				CBM	3.0
				CBM	5.0

Ampicilina 3





Corrida Ampicilina 3.

C) Amoxicilinas.

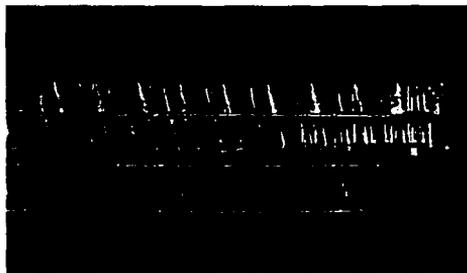
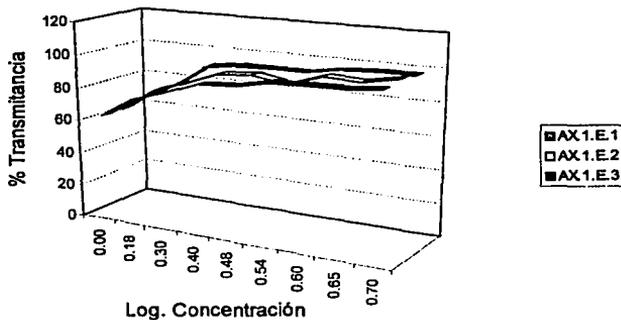
Microorganismo: <i>M. luteus</i>			% T. Inóculo estandarizado: 25.4		
Amoxicilina 1					
Ensayo: 1					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	15.8	Incontable	-
0.5	Turbio	3	47.2	Incontable	-
1	Lig. Turbio	2	62.8	Incontable	-
			74.8	Incontable	-
2	Negativo	1	81.3	Incontable	-
2.5	Negativo	1	88.6	Incontable	-
3	Negativo	1	90.0	98	9800
3.5	Negativo	1	93.7	76	7600
4	Negativo	1	94.8	46	4600
4.5	Negativo	1	95.0	24	2400
5	Negativo	1	96.6	18	1800
CONTROL (-)	Negativo		104.5	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		15.8	Incontable	
C+ 1X10 ⁷				Incontable	
C+ 1X10 ⁸					7
C+ 1X10 ⁹					

Ensayo: 2					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	20.1	Incontable	-
0.5	Turbio	3	44.7	Incontable	-
1	Liq. Turbio	2	63.1	Incontable	-
2	Negativo	1	78.4	Incontable	-
2.5	Negativo	1	83.4	Incontable	-
3	Negativo	1	90.6	65	6500
3.5	Negativo	1	88.7	42	4200
4	Negativo	1	96.2	59	5900
4.5	Negativo	1	94.8	28	2800
5	Negativo	1	99.0	11	1100
CONTROL (-)	Negativo		104.9	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		20.1	Incontable	
C+ 1X10 ⁴				Incontable	
C+ 1X10 ⁵				21	
C+ 1X10 ⁶				5	

5 µg/mL
 6 µg/mL
 7 µg/mL
 8 µg/mL
 9 µg/mL
 10 µg/mL
 11 µg/mL
 12 µg/mL
 13 µg/mL
 14 µg/mL
 15 µg/mL
 16 µg/mL
 17 µg/mL
 18 µg/mL
 19 µg/mL
 20 µg/mL
 21 µg/mL
 22 µg/mL
 23 µg/mL
 24 µg/mL
 25 µg/mL
 26 µg/mL
 27 µg/mL
 28 µg/mL
 29 µg/mL
 30 µg/mL
 31 µg/mL
 32 µg/mL
 33 µg/mL
 34 µg/mL
 35 µg/mL
 36 µg/mL
 37 µg/mL
 38 µg/mL
 39 µg/mL
 40 µg/mL
 41 µg/mL
 42 µg/mL
 43 µg/mL
 44 µg/mL
 45 µg/mL
 46 µg/mL
 47 µg/mL
 48 µg/mL
 49 µg/mL
 50 µg/mL
 51 µg/mL
 52 µg/mL
 53 µg/mL
 54 µg/mL
 55 µg/mL
 56 µg/mL
 57 µg/mL
 58 µg/mL
 59 µg/mL
 60 µg/mL
 61 µg/mL
 62 µg/mL
 63 µg/mL
 64 µg/mL
 65 µg/mL
 66 µg/mL
 67 µg/mL
 68 µg/mL
 69 µg/mL
 70 µg/mL
 71 µg/mL
 72 µg/mL
 73 µg/mL
 74 µg/mL
 75 µg/mL
 76 µg/mL
 77 µg/mL
 78 µg/mL
 79 µg/mL
 80 µg/mL
 81 µg/mL
 82 µg/mL
 83 µg/mL
 84 µg/mL
 85 µg/mL
 86 µg/mL
 87 µg/mL
 88 µg/mL
 89 µg/mL
 90 µg/mL
 91 µg/mL
 92 µg/mL
 93 µg/mL
 94 µg/mL
 95 µg/mL
 96 µg/mL
 97 µg/mL
 98 µg/mL
 99 µg/mL
 100 µg/mL

Ensayo: 3					
Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	17.0	Incontable	-
0.5	Turbio	3	46.5	Incontable	-
1	Liq. Turbio	2	66.0	Incontable	-
2	Negativo	1	78.0	Incontable	-
2.5	Negativo	1	89.5	Incontable	-
3	Negativo	1	92.2	Incontable	-
3.5	Negativo	1	92.2	72	7200
4	Negativo	1	92.6	50	5000
4.5	Negativo	1	96.0	36	3600
5	Negativo	1	96.9	28	2800
5	Negativo	1	97.0	13	1300
CONTROL (-)	Negativo		103.9	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		17.0	Incontable	
C+ 1X10 ⁴				Incontable	
C+ 1X10 ⁵				30	
C+ 1X10 ⁶				9	

Amoxicilina 1



Corrida Amoxicilina 1.

Microorganismo: <i>M. luteus</i>	% T. Inóculo estandarizado: 25.5
Amoxicilina 2	

Ensayo: 1	Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
	0	Turbio	3	18.8	Incontable	-
	0.5	Turbio	3	63.8	Incontable	-
				82.1	Incontable	-
	1.5	Negativo	1	82.8	Incontable	-
	2	Negativo	1	83.6	Incontable	-
	2.5	Negativo	1	97.7	Incontable	-
	3	Negativo	1	98.7	259	25900

3.5	Negativo	1	98.7	202	20200
4	Negativo	1	99.0	136	13600
4.5	Negativo	1	100.5	53	5300
5	Negativo	1	101.7	19	1900
CONTROL (-)	Negativo		105.4	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		16.8	Incontable	
C+ 1X10 ⁰				Incontable	
C+ 1X10 ¹				61	
C+ 1X10 ²				1	

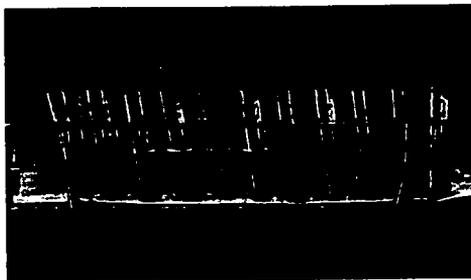
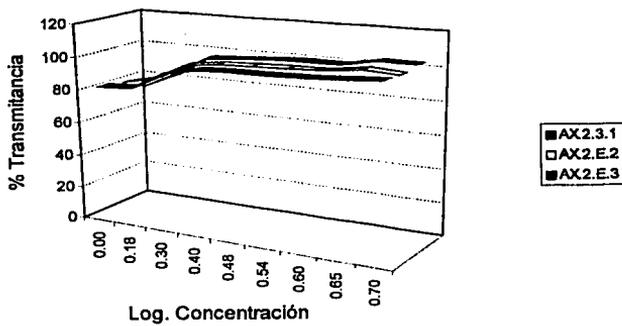
Ensayo: 2

Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	17.2	Incontable	-
0.5	Turbio	3	60.6	Incontable	-
1.5	Negativo	1	80.3	Incontable	-
2	Negativo	1	84.9	Incontable	-
2.5	Negativo	1	94.8	Incontable	-
3	Negativo	1	97.5	Incontable	-
3.5	Negativo	1	98.2	262	26200
4	Negativo	1	98.6	177	17700
4.5	Negativo	1	99.4	96	9600
5	Negativo	1	101.7	67	6700
5	Negativo	1	100.9	34	3400
CONTROL (-)	Negativo		105.9	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		17.2	Incontable	
C+ 1X10 ⁰				Incontable	
C+ 1X10 ¹				47	
C+ 1X10 ²				0	

Ensayo: 3

Concentración (µg/mL)	Crecimiento (Turbidez)	Clave	Transmitancia (%T)	Crecimiento (Colonias)	U.F.C./mL
0	Turbio	3	19.1	Incontable	-
0.5	Turbio	3	64.7	Incontable	-
1.5	Negativo	1	74.2	Incontable	-
2	Negativo	1	83.6	Incontable	-
2.5	Negativo	1	95.3	Incontable	-
3	Negativo	1	97.0	Incontable	-
3.5	Negativo	1	98.4	236	23600
4	Negativo	1	99.1	151	15100
4.5	Negativo	1	99.2	117	11700
5	Negativo	1	102.9	47	4700
5	Negativo	1	102.8	26	2600
CONTROL (-)	Negativo		105.8	Negativo	
CONTROL (+)	Turbio		19.1	Incontable	
C+ 1X10 ⁰				Incontable	
C+ 1X10 ¹				42	
C+ 1X10 ²				1	

Amoxicilina 2



Corrida Amoxicilina 2.

- RESULTADOS ESTADÍSTICOS.

1) Análisis por regresión lineal para binomios de antibióticos (%T).

A) Análisis de regresión lineal por binomios para Dicloxacilinas. (%T).

BINOMIO		R
Dicloxacilina 1 & Dicloxacilina 3		0.993
Dicloxacilina 1 & Dicloxacilina 2		0.994
Dicloxacilina 3 & Dicloxacilina 2		0.998

B) Análisis de regresión lineal por binomios para Ampicilinas. (%T).

BINOMIO		R
Ampicilina 1 & Ampicilina 2		0.998
Ampicilina 1 & Ampicilina 3		0.991
Ampicilina 2 & Ampicilina 3		0.992

C) Análisis de regresión lineal por binomios para Amoxicilinas (%T).

BINOMIO		R
Ampicilina 2 & Ampicilina 1		0.947

2) Promedios de las CIM Y CBM de los antibióticos.

• DICLOXACILINAS:

Ensayo	CIM	CBM
Ensayo 1	28	36
Ensayo 2	28	36
Ensayo 3	28	36
Ensayo 4		
Ensayo 5		
Ensayo 6	24	36
Ensayo 7	24	40
Ensayo 8	24	40
Ensayo 9	22	
Ensayo 10		
Ensayo 11		
Ensayo 12	32	36
Ensayo 13	32	36
Ensayo 14	32	36

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Promedio:	32	36
Prom. Gral:	28	36.9

• AMPICILINAS:

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina 1		
Ensayo 1	2.5	3.5
Ensayo 2	2.5	3.5
Ensayo 3	2.5	4.0
Promedio:	2.5	3.7
Ampicilina 2		
Ensayo 1	2.0	3.5
Ensayo 2	2.0	4.0
Ensayo 3	2.0	3.5
Promedio:	2.0	3.7
Ampicilina 3		
Ensayo 1	3.0	4.0
Ensayo 2	3.0	6.0
Ensayo 3	3.0	5.0
Promedio:	3.0	5.0
Prom. Gral:	2.5	4.1

• AMOXILINAS:

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
Amoxicilina 1		
Ensayo 1	1.5	4.0
Ensayo 2	1.5	4.5
Ensayo 3	1.5	4.0
Promedio:	1.5	4.2
Amoxicilina 2		
Ensayo 1	1.0	4.5
Ensayo 2	1.0	4.5
Ensayo 3	1.0	4.5
Promedio:	1.0	4.5
Prom. Gral:	1.25	4.3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se realizó el estudio comparativo por el método de regresión lineal entre los diferentes laboratorios de cada antibiótico, empleándose el programa SPSS versión 9; determinándose el coeficiente de correlación (R) en base a los datos de porcentaje de transmitancia de los multi ensayos en los antibióticos de prueba, comparándose los binomios entre laboratorios y su comportamiento ante un rango de concentraciones fijas y un mismo microorganismo de prueba. Así mismo se realizaron gráficas de correlación con curvas linealizadas de porcentaje de transmitancia y logaritmo de la concentración entre los triplicados, para cada laboratorio de cada antibiótico.

Por lo que de acuerdo a los coeficientes de correlación se observo con un intervalo de confianza del 95% que no existen diferencias significativas en el comportamiento entre los binomios de los antibióticos de los diferentes laboratorios con el mismo principio activo; esto indica que ante un mismo rango de concentraciones y un mismo microorganismo de prueba, el comportamiento entre dos antibióticos es similar, lo cual se corrobora en las gráficas elaboradas de los inter ensayos para cada antibiótico y laboratorio en particular, donde se observan variaciones mínimas entre los triplicados de acuerdo a las lecturas de transmitancia realizadas.

Por otra parte en los valores de turbidez no hay variación entre los triplicados de cada laboratorio, comparados entre los otros con el mismo principio activo y para cada antibiótico empleado; en los parámetros correspondientes a la determinación de CIM, se observan variaciones de 1 a 2 diluciones entre los

triplicados y entre los laboratorios de cada antibiótico; lo anterior se contrasta con la determinación de la CBM, la cuál varía de la misma forma, también en un rango de 1 a 2 diluciones de concentración entre los triplicados y entre los laboratorios de cada antibiótico, lo que indica que la actividad entre ellos es similar o que tiene casi el mismo comportamiento a las concentraciones y ante los microorganismos utilizados.

CONCLUSIONES.

De acuerdo a los coeficientes de correlación determinados entre los antibióticos de los diferentes laboratorios con un mismo principio activo, se generan las siguientes conclusiones para las penicilinas semisintéticas empleadas:

- 1) Para los antibióticos correspondientes a las dicloxacilinas; se presentan mínimas diferencias no significativas entre ellos respecto a su porcentaje de transmitancia y rango de concentración ante el mismo microorganismo de prueba *S. aureus*.
- 2) Para los antibióticos correspondientes a las ampicilinas; se presentan también mínimas diferencias no significativas entre ellos, respecto a sus porcentajes de transmitancia y concentración ante el mismo microorganismo de prueba *M. luteus*.
- 3) Para los antibióticos correspondientes a las amoxicilinas; se presentan mínimas diferencias ligeramente acentuadas pero no significativas entre ellos

(respecto a los otros antibióticos), respecto a su porcentaje de transmitancia y concentración ante el mismo microorganismo de prueba *M. luteus*.

A lo correspondiente a las CIM y CBM, en la mayoría de los casos se concluye que son similares para cada principio activo y sus laboratorios productores; con una variación 1 a 2 diluciones de concentración de los antibióticos, ante los microorganismos de prueba específicos, manifestando la gran similitud en su comportamiento antimicrobiano o propiedades bactericidas y bacteriostáticas.

Por ultimo se concluye que el método de dilución en tubo se puede emplear por su sencillez como tamiz en la evaluación y la comparación de antibióticos, en este caso penicilinas semisintéticas, con el mismo principio activo pero elaborados por diferentes laboratorios; ya que es capaz de encontrar diferencias entre ellos cuando no existe un comportamiento antimicrobiano similar (Potencia microbiológica), en base a la determinación del porcentaje de transmitancia, CIM y CBM ante un rango de concentraciones y microorganismos de prueba específicos.

SUGERENCIAS.

Según lo observado durante la realización de este trabajo se sugiere manejar con el mayor nivel de calidad los materiales, cepas y antibióticos empleados, evitando contaminaciones o mezclas entre los antibióticos, lo cual genera variaciones en los resultados de las determinaciones, y el retraso en el desarrollo metodológico.

También se recomienda para la determinación de turbidez el empleo de un turbidímetro, y que no quede sujeta a la observación visual ya que es un poco subjetiva y se somete a criterios de apreciación personales, que no permiten en ocasiones detectar realmente diferencias entre los tubos de las corridas lo cual afecta en los valores de determinación de la CIM.

Así mismo es recomendable para trabajos posteriores el empleo de antibióticos y cepas ATCC, empleándolos con el mismo método de dilución en tubo; para que después sus resultados sean usados para la comparación entre los antibióticos comerciales o de diferentes productores, para establecer así sus valores o rangos de CBM y CIM, en una forma aceptable y comparable.

ANEXOS.

I. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

A) Medio de cultivo 1 para la prueba de potencia microbiológica de antibióticos según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.²⁷

Peptona.	6.0 g
Digerido Pancreático de caseína.	4.0 g
Extracto de levaduras.	3.0 g
Extracto de carne.	1.5 g
Glucosa.	1.0 g
Agar.	15.0 g
Agua destilada.	1000.0 mL
pH después de esterilización.	6.6 ± 0.1

B) Medio de cultivo Agar Soya Tripticaseína para conservación de cepas.

Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Si es necesario calentar ligeramente hasta disolver. Distribuir y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

II. GLOSARIO.

- **Ácido clavulánico.** Inhibidor natural de betalactamasas, producido por *Streptomyces clavuligerus*.
- **Anafilaxia.** Aumento de la sensibilidad del organismo a un antígeno, que administrado antes provoca una reacción normal.
- **Antibiosis.** En contra o que se usa contra la vida.
- **Antiséptico.** Agente que mata o inhibe a los microorganismos pero que no es dañino al tejido humano.
- **Atípico.** Estado o condición de no conformidad con un tipo. Celular. Signo histológico de malignización.
- **Colitis.** Inflamación del colón.
- **Colonia.** Población de células que crecen sobre un medio sólido provenientes de una sola célula.
- **Cuenta viable.** Medición de la concentración de células vivas en una población microbiana.
- **Cultivo.** Cepa o clase particular de un microorganismo que crece en un medio de laboratorio.
- **Desbridación.** Dilatación cuenta de una herida u orificio natural para facilitar la salida de un cuerpo extraño, cohibir una hemorragia, etc.
- **Eritema.** Enrojecimiento de la piel, por congestión de capilares y desaparece momentáneamente por la compresión.
- **Escarlatiniforme.** Exantema parecido al de la escarlatina.

- **Estéril.** Libre de organismos vivos.
- **Esterilización.** Tratamiento que consiste en dar muerte a todo organismo vivo en un material.
- **Exacerbación.** Aumento o exageración de la gravedad de un síntoma, dolor, fiebre o de una enfermedad.
- **Exantema.** Erupción, mancha cutánea.
- **Flebitis.** Inflamación de una vena.
- **Habón.** Elevación cutánea aplanada, a veces pruriginosa.
- **Infección.** Desarrollo de un organismo dentro de un cuerpo.
- **Inhibición.** Que evita el desarrollo o función.
- **Mácula.** Lesión cutánea que consiste en una mancha roja, no elevada y desaparece por vitropresión. Maculopápula: Lesión de la piel combinada de una mácula con una pápula.
- **Meteorismo.** Distensión del abdomen por gases contenidos en el tubo digestivo..
- **Monobactámico.** Compuestos semejantes a las penicilinas, que solo presentan en su estructura un anillo de tipo betalactámico ej. Aztreonam.
- **Mononucleosis.** Presencia de un gran número de leucocitos mononucleares en la sangre.
- **Nefritis.** Inflamación renal.
- **Nefrotoxicidad.** Acción tóxica o de intoxicación del riñón.

- **Pápula.** Elevación eruptiva pequeña, sólida y circunscrita de la piel que termina en descamación.
- **Patógeno.** Organismo capaz de causar daño a un huésped, el cual infecta.
- **Posología.** Parte de la terapéutica que se ocupa en las dosis o dosificación.
- **Potencia Microbiológica.** Determinación de la susceptibilidad de un microorganismo ante un antibiótico determinado en el menor tiempo y concentración posible.
- **Probeneclid.** Derivado del ácido benzoico , que inhibe el transporte tubular renal de los ácidos grasos. Se emplea para tener niveles plasmáticos de penicilina mas altos y persistentes.
- **Pruriginosa.** Afección caracterizada con sensación incitante a rascarse o de picor violento y pápulas.
- **Prurito.** Sensación que incita a rascarse.
- **Quimioterapia.** Tratamiento de una enfermedad infecciosa con sustancias químicas o antibióticos.
- **Septicemia.** Estado morbozo debido a la presencia de bacterias y sus productos en sangre.
- **Tamiz.** Art. Separar, distinguir, seleccionar.
- **Urticaria.** Erupción cutánea con pápulas de límites netos, elevadas con vértice aplanado acompañado de eritema y prurito.
- **Venoclisis.** Inyección de líquidos en una vena.

III. FOTOGRAFIAS.



Cepa de *S. aureus* en A.S.T



Cepa de *M. luteus* en A.S.T.



S. aureus y *M. luteus* en Solución Salina.

ANÁLISIS CON
FALLA DE ORIGEN

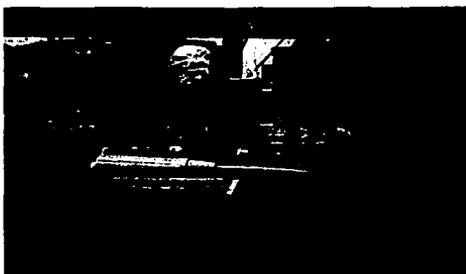


Ejemplo de diluciones de antibiótico en solución salina isotónica para dicloxacilina 1

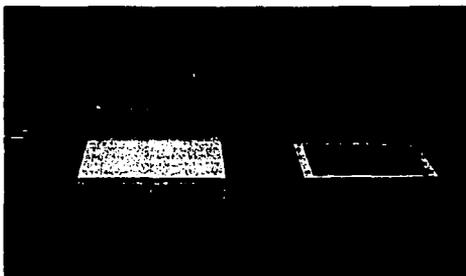


Observación de turbidez para determinar CIM; comparando tubos de una corrida de ampicilina 1 con sus controles positivos y negativos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Materiales empleados para la siembra en placas y determinación de CBM.



Espectrofotómetro y muestras para determinar % de transmitancia.

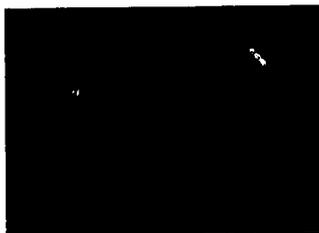
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Ejemplo de controles positivo y negativo para amoxicilina 2.



Siembra en placa de control positivo en dicloxacilina 1.



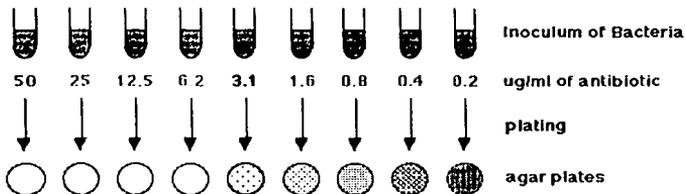
Siembra en placa de control negativo en dicloxacilina 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Placas de siembra de las diluciones del control positivo a 1×10^{-3} , 1×10^{-6} y 1×10^{-9} para amoxicilina 1.

IV. ESQUEMA DEL METODO DE DILUCIÓN EN TUBO.



Esquema del método de dilución en tubo para determinar CIM y CBM. El

esquema muestra una CIM en 3.1 ug/mL y una CBM en 6.2 ug/mL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO GENERAL.

No. Tubo.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11C-	12C+
Medio	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
m.o.. mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1
Antibiótico	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0
Concentración µg/mL	Depende del rango de sensibilidad del antibiótico.											
Volumen total mL	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2



Incubación a 35 – 37° por 24 hs



Lectura de turbidez visual y % de transmitancia.
(CIM)
Sembrar 10 µL de los tubos que no presenten turbidez en medio de cultivo No. 1,
en forma masiva.



Incubación a 35 – 37° por 24 hs



Lectura de cultivos determinando UFC/mL
(CBM)

REFERENCIAS.

1. Collard P. El desarrollo de la microbiología. Barcelona: Ed. Reverte S.A., 1985: 57-65
2. Wolfgang J K. Microbiología. 20ª. ed. Argentina: Ed. Médica Panamericana, 1986: 117-125
3. Bergoglio R T. Antibióticos. 4ª. ed. Argentina: Ed. Médica Panamericana, 1986: 117-125.
4. Tortora G J. Microbiology. 5ª. ed. U.S.A.: Ed. The Benjamin/Cummins Publishing Company, 1991: 497-513
5. Calderwood s. Principios del tratamiento antiinfeccioso. 2ª. ed. Cuba: Ed. Científico – Técnica, 1988: 1469-1486.
6. Bowman W C. Farmacología: Bases químicas y patológicas. 2ª. ed. Cuba: Ed. Científico – Técnica, 1987; 13: 6-16
7. Jawetz E. Microbiología Médica. 15ª. ed. México: Ed. El manual moderno S.A. de C.V., 1996: 57-61
8. Cordies J L. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Médica; 1998: 8(1): 13-27
9. Davis B D. Tratado de microbiología. 3ª. ed. Barcelona: Ed. Salvat S.A., 1990: 472-482
10. Goodman G A. Las bases farmacológicas de la de la terapéutica. Cuba: Ed. Científico – Técnica, 1982; vol. 2:110-153
11. Brock P V. Antimicrobial Drugs, microorganism and phagocytes. Rev. Infect. Dis. 1989;2:213-218

12. Wright A, Wikoushe J. The penicilins. *Mayor. Clin. Proc.* 1987; 62:806-819
13. Thompson B I. Cephalosporin, carbapenem and monobactam antibiotics. *Mayor. Clin. Proc.* 1987; 62: 821-832
14. Lambert H. Antibiotic and chemotherapy. 6a. ed. Londres: Ed. Churchill Livingstone, 1992: 291-302
15. Hocprich P. Tratado de enfermedades infecciosas. 2ª. ed. Cuba: Ed. Científico – Técnica, 1985; vol. 1: 154-190
16. Pelczar M J. Microbiología. 2ª. ed. México: Ed. Mc Graw – Hill, 1982: 408-430
17. Wilkouse C J. General principles of Antimicrobial therapy. *Mayor. Clin. Proc.* 1987; 62: 789-795
18. Reubeu A G. Polymicrobial bacteremia: clinical and microbiologic pattens. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11: 161
19. Volk W A. Microbiología Médica. México: Ed. Interamericana Mc Graw – Hill, 1988: 302-319, 327-332
20. Reyes M A. Vademécum de medicamentos antiinfecciosos. 2ª. ed. México: Ed. P.L.M., S.A. de C.V., 1999: 12-18
21. Kagan M B. Tratamiento con antibióticos. México: Ed. Nueva Interamericana, 1989: 3-15
22. Burrows W. Tratado de microbiología. 2ª. ed. México: Ed. Interamericana S.A. de C.V., 1974: 144-148
23. Baker F J. Manual de técnicas de microbiología médica. España: Ed. Acribia S.A., 1990: 437-446

24. Findengold S M. Diagnóstico Microbiológico. 7ª. ed. Argentina: Ed. Médica Panamericana, 1991: 190-210
25. Koneman E W. Diagnóstico Microbiológico. 3ª. ed. Argentina: Ed. Medica Panamericana, 1992: 564-609
26. Méndez R I. El protocolo de investigación. México: Ed. Trillas, 1986: 11-14
27. Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª. ed. México: Ed. Talleres gráficos de publicaciones e impresiones de calidad S.A. de C.V., 2000: Vol. 1 Y 2: 193-201
28. Remington's. Pharmaceutical Sciences. 17ª. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A., 1990: Vol.2: 1620-1623
29. Calderón J E. Aplicación clínica de los antibióticos y quimioterapicos. 7ª. ed. México: Méndez Editores, 1997: 15-31, 110-124
30. Glasby J S. Enciclopedia de antibióticos. España: Editorial AC, Libros científicos y técnicos, 1976: 56-57, 286-287
31. Conte J E. Manual de antibióticos y enfermedades infecciosas. 5ª. ed. España: Editorial Intermedica, Esapaña S.A., 1985: 13-14, 16-17, 38-39
32. Murray P R. Microbiología médica. Madrid: Editorial Mosby-Doyma Libros, S.A., 1996: 37-45.
33. Hammond S M. Antibiotics and antimicrobial action. Barcelona: Editorial Omega S.A.,1980: 20-36.