

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**ANALISIS COMPARATIVO ENTRE DOS METODOS MICROBIOLOGICOS**  
**PARA LA DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A**  
**ANTIMICROBIANOS**

**T E S I S**  
**P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E**  
**Q U Í M I C O F A R M A C É U T I C O B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A :**  
**I S R A E L P O B L A N O M E L É N D E Z**

MEXICO, D.F.

2006



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.

Agradezco a mis padres Alicia e Inocente, por su apoyo y fe, gracias a su ayuda, amor y confianza que me impulsaron a llegar a esta meta con esfuerzo y dedicación y nunca dejaron de alentarme.

A mis hermanos Martín e Itzel, por el cariño y confianza que me han brindado.

A Lilia, por todo el amor y confianza, por el apoyo en cualquier momento que me impulsaron a seguir luchando por mis metas, gracias por todo este tiempo y espero se siga prolongando por mucho mas.

A la Maestra Maria del Pilar Granada Macias, por la confianza y por ser un ejemplo a seguir.

Al Departamento de Posgrado de Inorgánica de la Facultad de Química, en especial a la Dra. Nora Barba, el Dr. Horacio y a Milton, por su confianza y permitirme ser parte de este proyecto.

A todas las personas de la sección de medios de cultivo de la Facultad de Química, por todo su apoyo y ayuda prestada.

Al personal de laboratorio de Tecnología Farmacéutica en especial a la Maestra. Ma. del Socorro Alpizar R. por su apoyo y amistad.

A mis amigos Queto, Jorge, Oscar, Liliana, Raúl, Rocío, Carlos, Daniel, Ricardo, Cristina, Mayra, Karina, Kyoko, Rafael, por todo su apoyo y ser buenos amigos.

A mis amigos Benjamín, Israel, Joel, Cesar, Noe, Araceli, Patricia por estar conmigo en todo momento.

A mis tíos y primos por su amistad y apoyo.

## INDICE

<b>1.0</b>	<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2.0</b>	<b>Objetivos</b>	<b>4</b>
<b>3.0</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Métodos por dilución</b>	
3.1.1	Dilución en Agar	7
3.1.2	Dilución en caldo	
3.1.2.1	Método de macrodilución	9
3.1.2.2	Método de microdilución	10
<b>3.2</b>	<b>Métodos por difusión</b>	
3.2.1	Método del antibiograma disco-placa	11
<b>3.3</b>	<b>Métodos comerciales</b>	<b>16</b>
<b>4.0</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	
<b>4.1</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b>	
4.2.1	Metodología de Bauer – Kirby modificada	20
4.2.2	Método de difusión en agar con cilindros	21
<b>5.0</b>	<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<b>6.0</b>	<b>Discusión de resultados</b>	<b>31</b>
<b>7.0</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>8.0</b>	<b>Anexos</b>	<b>35</b>
<b>9.0</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>57</b>

# ANALISIS COMPARATIVO ENTRE DOS METODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos destinados a eliminar los agentes bacterianos que causan numerosas enfermedades, deben someterse a pruebas que determinan, tanto la susceptibilidad de los microorganismos, como la concentración ideal para obtener efectos terapéuticos, es decir deben ser sometidos a pruebas de sensibilidad. Estas se definen como la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y reflejan la capacidad que tiene una sustancia para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana a cierta concentración. Los resultados de estas pruebas, así como la farmacología del antibiótico en el lugar de la infección y los aspectos clínicos del paciente, sustentan la elección de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, asimismo, ofrecen en su conjunto elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos.

Los ensayos de sensibilidad deben estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección *in vivo* y por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad.

Debido a la existencia de diversos grupos de trabajo que sintetizan diferentes sustancias constantemente se busca contar con una determinación rápida de bajo costo con un mínimo de consumo de sustancias que arroje datos sobre la sensibilidad o resistencia de algún microorganismo frente a estas sustancias y posteriormente, si es necesario, estudiar a este nuevo compuesto como antimicrobiano, aplicando técnicas más completas y costosas. Tal es el caso del grupo de la Dra. Nora Barba Behrens del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la división de estudios de Postgrado de la Facultad de Química con quien se realizó el presente trabajo.

## 2.0 OBJETIVOS

### Objetivo general

- Analizar y comparar dos métodos microbiológicos para determinar la sensibilidad de diferentes microorganismos frente a antimicrobianos de origen sintético, derivados del albendazol.

### Objetivos específicos

- Realizar pruebas de sensibilidad por el método modificado de Bauer – Kirby.<sup>(1)</sup>
- Realizar pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar<sup>(2)</sup> con los mismos compuestos y microorganismos utilizados para el método de Bauer – Kirby modificado.
- Analizar los datos obtenidos en ambos métodos y compararlos entre si
- Definir si el método modificado de Bauer – Kirby, sirve como análisis previo a un método mas específico
- Evaluar las ventajas que ofrece este método modificado de Bauer - Kirby

---

<sup>(1)</sup>Bauer AW. Kirby WMM. 1966

<sup>(2)</sup>Garcia, R.J. 2000

## 3.0 MARCO TEÓRICO

### 3.1 MÉTODOS DE DILUCIÓN

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de este, previamente diluido en el medio de cultivo (líquido o sólido).

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. La gran cantidad de variables; tipo de microorganismo, medios de cultivo utilizados, concentración del inóculo, concentración del antimicrobiano, etc. que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado final, por lo que, para su correcta evaluación, es necesario que se realicen de forma estandarizada.

Los primeros métodos utilizaron tubos con caldo de cultivo al que se le añadía un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Sin embargo esta metodología resultaba poco práctica, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización.<sup>(3)</sup>

La utilización de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo debido a que disminuyó el consumo de reactivos; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi)automáticos de lectura e interpretación de resultados,<sup>(4)</sup> pero con el grave inconveniente del incremento en el costo. Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano, utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del

---

(3) National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000

(4) C.N. , Stoker, S. A. 1991

microorganismo se realiza la lectura, determinando la concentración que causa la inhibición total del crecimiento bacteriano.

La determinación de la actividad antimicrobiana mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2) en vez de una escala continua (como sucede en el método de difusión), por lo que los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) reales de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Desde el punto de vista clínico la diferencia entre los valores real y experimental de CMI no suelen ser trascendentes cuando se trata de concentraciones bajas, pero pueden tener importancia para las CMIs altas que se acerquen a las concentraciones alcanzables in vivo.

En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros. <sup>(5)</sup>

Los antimicrobianos a usar en las técnicas de dilución pueden obtenerse de los correspondientes fabricantes, o comprarse directamente a compañías comerciales. Para los estudios in vitro no es adecuado utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben emplearse sustancias valoradas de las que se conozcan la potencia (mg de sustancia pura por cada mg de sustancia valorada), la fecha de caducidad y el lote de preparación. Las sustancias valoradas deben conservarse siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor. En el caso de usar desecadores para la conservación, hay que evitar la formación de agua de condensación por lo que, tras sacarlos del frigorífico/congelador, se deben abrir sólo cuando hayan alcanzado la temperatura ambiente. <sup>(6)</sup>

La sustancia valorada debe pesarse en una balanza de precisión. Para conseguir una determinada concentración, lo más sencillo es pesar con un ligero exceso una cantidad de sustancia y, posteriormente, añadir el volumen de diluyente necesario <sup>(7)</sup>. Como resulta obvio, para calcular una determinada concentración de antimicrobiano hemos de

---

(5) National Committee for Clinical Laboratory Standards.2000

(6) H. D., Isenberg. 1992

(7) Grupo MENSURA 2000.

considerar la pureza de la sustancia que se esté empleando (que en la mayoría de casos no es del 100%). Las concentraciones de antimicrobianos deben prepararse más concentradas que la concentración más alta que se vaya a evaluar, es decir, la concentración debe ser superior a 1000 mg/l. En la **Tabla 1**<sup>(8)</sup> (Anexo I) se indican los diluyentes y solventes necesarios para la preparación de los antimicrobianos más habituales. No es necesario esterilizar las soluciones de antimicrobianos porque la contaminación de estas soluciones es poco frecuente.

Las soluciones de antimicrobianos se deben emplear el mismo día de su preparación, alternativamente, se pueden congelar en alícuotas (usando tubos estériles de vidrio o plástico) la temperatura ideal para la conservación de estas soluciones es de al menos -60°C, en todo caso nunca superior de -20°C. Se acepta que a temperaturas de -60 las soluciones madres de antimicrobianos son estables, con muy contadas excepciones, durante al menos 6 meses, en la **Tabla 2**<sup>(8)</sup> (Anexo I) se indica la estabilidad de las diluciones de antimicrobianos a otras temperaturas. En las **Tablas 3a y 3b**<sup>(9)</sup> (Anexo I) se recogen esquemas sugeridos de preparación de diluciones de antimicrobianos para usar en los métodos de dilución en agar y de dilución en caldo, respectivamente.

### 3.1.1 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar al medio, en la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser necesario añadir algún suplemento a este medio o emplear un medio diferente. El antimicrobiano y/o los suplementos se añaden cuando el medio estéril aún está fundido (debemos mencionar que este medio y sus especificaciones son las mismas para todos los métodos que se mencionarán).

Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan una vez que el medio de cultivo haya solidificado. Se utiliza una placa de cada concentración para

---

(8) H. D., Isenberg, 1992

(9) NCCLS. Disk diffusion supplemental 2000

cada microorganismo a probar. Para placas circulares de 90 mm de diámetro son necesarios 20 ml de medio con antimicrobiano (habitualmente en la proporción 19 ml de medio por 1 ml de solución del antimicrobiano). Para trabajos de referencia las placas no se deben almacenar más de cinco días, sin olvidar que algunos antimicrobianos (como ampicilina, meticilina, imipenem, ácido clavulánico etc.)<sup>(10)</sup> son poco estables y por ello, se deben usar el mismo día de su preparación. Si las placas se encuentran en el refrigerador, al sacarlas se deben dejar a temperatura ambiente unos 30 minutos antes de proceder a su inoculación, comprobando que no exista agua de condensación en la superficie de las mismas. Las placas húmedas se pueden secar en estufa dejando las tapas entreabiertas. Para cada serie de concentraciones se debe incluir al comienzo y al final una serie de placas de medio sin antimicrobiano que servirán para controlar el crecimiento y la posibilidad de contaminación durante el proceso de inoculación.

En cualquier caso, la evaluación de los resultados obtenidos con placas almacenadas según las condiciones indicadas sólo debe realizarse cuando los resultados con las cepas en las placas de control estén dentro de los márgenes (**Tablas 4-7 Anexo I**)

Para aplicar el inóculo se utilizan aplicadores, que suelen dispensar gotas (de aproximadamente 5 mm de diámetro) con un volumen de 1 a 2  $\mu$ l. El inóculo que debe contener cada una de estas gotas debe ser de aproximadamente  $10^4$  UFC, por lo que la suspensión original a usar con el aplicador debe tener  $10^7$  UFC/ml. Habitualmente se prepara una suspensión concentrada de  $10^8$  CFU/ml que posteriormente se diluye 1:10. Este estándar corresponde, en la mayoría de los laboratorios, al 0.5 de la escala de Mac Farland <sup>(11)</sup>. Esta turbidez se logra por comparación visual ó espectrofotométrica (densidad óptica de 0.08-0.10 a 625 nm, equivalente a  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml ). Este inóculo debe usarse antes de 15 minutos. Para iniciar el ensayo se deben preparar las series de placas iniciando la inoculación del control sin antimicrobiano, se continúa a partir de la placa con menor concentración de antimicrobiano y se finaliza sembrando una nueva placa de control sin antimicrobiano<sup>(12)</sup>. Posteriormente se incuban y se procede a su lectura.

La CMI es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada

---

(10) Acar, J. F., Goldstein F.W. 1996.

(11).García R. J., 2000.

(12) H. D. Isenberg., 1992

o de un halo tenue debido al propio inóculo). Ocasionalmente pueden observarse algunas colonias o franco crecimiento en concentraciones superiores a la CMI aparente; en estos casos se debe comprobar la pureza del inóculo para descartar una contaminación; si esta última se confirma deberá repetirse el estudio.<sup>(13)</sup>

### **3.1.2 METODOS DE DILUCIÓN EN CALDO**

Existen dos modalidades de los métodos de dilución: los macrométodos, que utilizan tubos y el micrométodo donde se usan placas de microtitulación .

#### **3.1.2.1 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN**

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una serie de tubos. Habitualmente se prepara la serie de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano donde se tendrá la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, de esta solución diluida se inocularan los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá con 1ml de medio y así la concentración de antimicrobiano quedara a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo.<sup>(14)</sup>

#### **3.1.2.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN**

En este método cada pocillo de la placa de microtitulación, de fondo en "U", representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio

---

(13) NCCLS Methods for dilution, 2000.

(14) García, R. J., 2000.

laboratorio o bien se pueden comprar a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados.

Las placas disponibles con 96 pocillos (12 columnas x 8 hileras), nos permiten estudiar 8 antimicrobianos y 11 diluciones para el mismo microorganismo, la última columna se utiliza como control de crecimiento. En ocasiones se preparan placas con 12 diluciones de antimicrobiano y se utiliza una placa adicional para realizar los controles. El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100  $\mu$ l, por lo que antes de la inoculación los pocillos deben contener la cantidad de medio y la de antimicrobiano en una proporción del 50% para cada uno del volumen final sin tomar en cuenta el volumen de inóculo que se va a utilizar; si este es menor a 10  $\mu$ l, o bien si se adicionan 50  $\mu$ l del medio con antimicrobiano (es decir 25 $\mu$ l de antimicrobiano y 25 $\mu$ l de medio) se adicionará 50  $\mu$ l de inóculo. Para este último caso debe tenerse en cuenta al calcular la concentración inicial más alta, que después de añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad.

El proceso completo a seguir es el siguiente: Las placas se llenan utilizando una pipeta multicanal con 100 o 200 $\mu$ l de la solución más alta de antimicrobiano en la columna 1, posteriormente se añade un volumen de 50 o 100 $\mu$ l de caldo sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 2 a 11 y se realiza la dilución en la forma habitual, dejando los pocillos de la última columna como controles (positivos - no antimicrobiano- y negativos - no inóculo-).<sup>(15)</sup> Para controlar el inóculo se hace un recuento en placa, que una vez incubadas, permiten el recuento del inóculo realmente usado. Una forma sencilla de realizar este recuento es diluir del tubo o del pocillo de control positivo en suero salino, sembrando posteriormente esta dilución.

Las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Los tubos o placas se incubarán en las condiciones necesarias, para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se deben apilar más de cuatro o cinco placas.

Tras la incubación se procede a la lectura de los resultados. La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente (o el 80% en el caso de las sulfamidas) el crecimiento del microorganismo estudiado. La

---

(15) Palavecino, R. E., 1997.

interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación<sup>(16)</sup>

En general, los valores de CMI obtenidos mediante microdilución son iguales o una dilución menor a los que se obtienen por macrodilución<sup>(17)</sup>

## **3.2 MÉTODOS DE DIFUSIÓN**

### **3.2.1 MÉTODO DEL ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer-Kirby<sup>(18)</sup> es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una caja de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel filtros impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Después de 18 a 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre las bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no

---

(16) Amsterdam, D. 1996.

(17) Palavecino R. E., 1997.

(18) Bauer, A.W., Kirby W. M. M., 1966.

permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (Por ejemplo con el método de dilución), se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de las cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "Recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en la gráfica. Existen, por tanto, diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición deben interpretarse como: **Sensible (S)**, **Intermedia (I)** o **Resistente (R)** según las categorías establecidas por el NCCLS. (**Tablas 4-7 Anexo I**)<sup>(19)</sup>.

El término sensible indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición, puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, en función del tipo de infección y de la especie considerada.

El término intermedio indica que el halo de inhibición traducido en valores de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano (p. ej. orina) o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual. El NCCLS también incluye en esta categoría aquellos casos de antimicrobianos con márgenes de toxicidad estrechos en los que pequeños errores técnicos podrían suponer cambios de interpretación en la categoría clínica.

Finalmente, el término resistente se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.

---

(19) NCCLS. Disk diffusion supplemental tables. 2000

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como uno de los marcadores epidemiológicos disponibles. El método de disco-placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente aerobias no exigentes de crecimiento rápido como, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.* <sup>(20)</sup>

El agar Mueller-Hinton que se utiliza en este ensayo, debe ser regulado en su concentración de iones divalentes, este medio posee una concentración baja de iones divalentes y debe ser suplementado para obtener concentraciones fisiológicas (20 a 35 µg/litro de Mg<sup>2+</sup> y 50 a 100 µg/litro Ca<sup>2+</sup>). Este medio es el recomendado por la NCCLS porque en él crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas y hay muy pocas diferencias entre los distintos lotes comercializados lo que ayuda a una estandarización entre laboratorios, además no contiene timina o timidina, que son inhibidores de sulfamidas y de trimetoprim. El pH del medio se ajusta entre 7.2-7.4, debe almacenarse entre 2 y 8°C y utilizarse dentro de los 7 días siguientes a su preparación. El medio se deja a temperatura ambiente dos horas antes de utilizarlo. Los discos de antibióticos a utilizar, se guardan a 4°C y 1 hora antes de probarlos se dejan expuestos a temperatura ambiente. Los discos se almacenan en congelación si son antimicrobianos beta-lactámicos y duran una semana en refrigeración. Por regla general, se recomienda reemplazar los discos de beta-lactámicos que están refrigerados por más de una semana con aquellos que se encuentran congelados. El deterioro de los discos ocurre si son sometidos a condiciones de humedad o a frecuentes cambios de temperatura, en el caso de utilizar discos en dispensador, éste debe tener una tapa muy ajustada y un desecante que será substituido cuando por exceso de humedad cambie de color el indicador. El dispensador debe mantenerse refrigerado cuando no se vaya a utilizar.

---

<sup>(20)</sup> NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk. 2000

La preparación del inóculo que se utiliza en este método se puede realizar en dos formas:

**Método del medio de cultivo líquido:** Tomar de 3 a 5 colonias iguales de una placa con cultivo que tenga de 18 a 24 horas mínimo de crecimiento y sembrarlas en 5 ml de un medio líquido (Brain-Heart, Todd Hewitt, Trypticase soya, etc.) e incubar en la estufa a 35°C de 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. Si la turbidez es superior se realiza el ajuste necesario con solución salina estéril <sup>(21)</sup>

**Método de suspensión directa de colonias:** A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas tomar varias colonias con un asa y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland en solución salina estéril. Agitar en un agitador "Vortex" de 15 a 20 segundos <sup>(21)</sup>

Se recomienda utilizar el primer método si el cultivo tiene más de 24 horas de incubación. El segundo método es el más adecuado para microorganismos de crecimiento difícil en medios líquidos como: *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, Estreptococos no enterococos, *Listeria*, *Moraxella* y *Corynebacterium* spp. y para estafilococos en los que se quiera detectar la resistencia a oxacilina. <sup>(22)</sup>

La inoculación de las placas debe realizarse antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, para ello, se introduce un asa dentro de la suspensión y al retirarla se agita varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo; para no dejar ningún área libre, se desliza el asa por la superficie estriando el agar tres veces, rotando la placa 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos.

Los discos se colocan con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles, debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que se presionan ligeramente sobre su superficie. Los discos no deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca

---

(21) Garcia, R J., 2000

(22) NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk., 2000.

superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplearán más de 12 discos y para las de 100 mm no más de 6

Las placas son incubadas de manera invertida (agar en la parte superior), en grupos no superiores a 5 placas a una temperatura de 35°C de 16 a 18 horas (para estafilococos sensibles a meticilina debe prolongarse la incubación hasta 24 horas para confirmar la ausencia de resistencia a este último).<sup>(23)</sup>

Después de 18 horas de incubación se lee el diámetro de las zonas de completa inhibición con un calibrador Vernier o regla. Si el microorganismo es un estafilococo o un enterococo debemos esperar 24 horas para asegurar la sensibilidad a la oxacilina y vancomicina. Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar. En las pruebas de sensibilidad a meticilina en estafilococos el halo alrededor debe observarse utilizando luz transmitida para visualizar las colonias diminutas.

Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa, a excepción de estafilococos resistentes a oxacilina o enterococos resistentes a vancomicina.<sup>(24)</sup>

Como regla importante se considera que las cepas de estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los beta-lactámicos, incluyendo la combinación beta-lactámico más un inhibidor de beta-lactamasas, todas las cefalosporinas, penicilinas y los carbapenems.<sup>(25)</sup>

---

(23) NCCLS. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing., 1997.

(24) Miller L.A., Rittenhouse S.F., 1994.

(25) Jorgensen, J.H., 1998.

### **3.3 MÉTODOS COMERCIALES**

En la actualidad se pueden encontrar una gran variedad de métodos comerciales y semi automáticos los cuales son muy eficientes pero pueden ser muy costosos en el Anexo II se describen dos de estos métodos: el Epsom test y el ATB STAPH (Antibiograma para estafilococos)

## 4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

Con modificación planteada se determinó la actividad antimicrobiana a los derivados del albendazol. La síntesis se llevo acabo en el Laboratorio de Química Inorgánica y Nuclear de la División de Estudio de Posgrado que se describe en el Anexo III. Estos compuestos fueron sintetizados utilizando como ligantes bencimidazol (bz), 2-aminobencimidazol (2ab), albendazol (abz), y tris(2-bencimidazolilmetil)amina (ntb) y cordinandose con Cobalto (Co), Zinc (Zn), y Bromo (Br). Cada compuesto se probó con una única concentración de 5000 µg/ml sobre las cepas siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*; con esto se determinó cuales compuestos tuvieron actividad antimicrobiana, con ellos se continuó trabajando en la validación de la modificación propuesta. Para ello se probaron los compuestos que resultaron positivos en el método anterior, ahora con el método cilindro placa. Las concentraciones con las cuales se trabajaron cada uno de los compuestos fueron: 1.6µg/ml, 2.5µg/ml y 3.9µg/ml, dichas concentraciones son la mas baja, la media y la mas alta, respectivamente, utilizadas y recomendadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para los antibióticos utilizados como control en esté trabajo. Se realizó la prueba utilizando las cepas *E.coli* y *M.luteus*; los estándares recomendados para estos microorganismos control son: Cloranfenicol y Amoxicilina respectivamente. Las concentraciones utilizadas para el Cloranfenicol y para la Amoxicilina fueron las mismas que se usaron para los derivados del albendazol<sup>(26,27)</sup>.

Por último se llevó a cabo la comparación entre el método Bauer-Kirby modificado y el método cilindro-placa, utilizando en las pruebas las cepas *E.coli* y *M.luteus* con las mismas concentraciones que en el paso anterior. Esto nos permitió saber que tan confiable y eficiente es el método modificado en relación con el ya establecido de difusión en agar utilizando cilindros.

---

(26) Code of Federal Regulations., 1990.

(27) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., 2000.

## 4.1 MATERIALES

### 4.1.1. REACTIVOS

\*Solución salina isotónica (SSI), NaCl al 0.85% en agua.

\*Antimicrobianos:

[Co(bz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Co(bz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Co(bz)(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Zn(bz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Zn(bz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Zn(bz) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O	5000µg/ml en DMSO
[Co(2ab) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Co(2ab) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
Co(2ab)(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5000µg/ml en DMSO
[Zn(2ab) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Zn(2ab) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Zn(2ab) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Co(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] 2H <sub>2</sub> O *	5000µg/ml en DMSO
[Co(abz) Br <sub>2</sub> ] 3H <sub>2</sub> O *	5000µg/ml en DMSO
[Co(abz) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] H <sub>2</sub> O *	5000µg/ml en DMSO
[Zn(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 3H <sub>2</sub> O	5000µg/ml en DMSO
[Zn(abz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 2H <sub>2</sub> O	5000µg/ml en DMSO
[Zn(abz) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Co(ntb)Cl] Cl 2H <sub>2</sub> O	5000µg/ml en DMSO
[Co(ntb)Br] Br 2H <sub>2</sub> O	5000µg/ml en DMSO

[Co(ntb)NO <sub>3</sub> ] NO <sub>3</sub>	5000µg/ml en DMSO
[Zn(ntb)Cl] <sub>2</sub> [ZnCl <sub>4</sub> ].4EtOH	5000µg/ml en DMSO
[Zn(ntb)Br] <sub>2</sub> [ZnBr <sub>4</sub> ]	5000µg/ml en DMSO
[Zn(ntb)NO <sub>3</sub> ] NO <sub>3</sub> [Zn(ntb)(H <sub>2</sub> O)] 2NO <sub>3</sub>	5000µg/ml en DMSO

#### 4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

\* Agar Muller - Hinton Marca. Bioxon. Lote: 0661027

Infusión de carne	2.0g
Caseina hidrolizada	17.5g
Almidón	1.5g
Agar-Agar	12.5g

pH del medio listo para usarse a37°C 7.4± 0.2

Suspender 36.5g en 1litro de agua destilada o completamente desmineralizada dejar remojar durante 15 minutos. Calentar a ebullición hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave 15minutos a 121°C

#### 4.1.3 EQUIPO

Incubadora 20 – 60 °C  
 Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001g  
 Mechero Bunsen  
 Nefelómetro Klett  
 Gabinete de seguridad Clase II Tipo A/B3  
 Autoclave con termómetro y/o manómetro

#### 4.1.4 MATERIAL

- 6 Matraces Nefelométricos de 250ml
- 30 Tubos de ensaye de 22x175mm para contener los antimicrobianos
- 3 Micropipetas : 0-20µl, 5-200µl, 200 -1000µl
- 2 Pinzas de disección
- 2 Asa bacteriológica
- 6 Pipetas de 1ml, con graduación de 0.1ml
- 2 Espátulas de acero
- 1 Calibrador Vernier

Discos de papel Whatman del #1 de 5mm de diámetro  
Cilindros de acero inoxidable  
Cajas Petri estériles de plástico de 100mm de diámetro (desechables)

#### **4.1.5 CEPAS MICROBIANAS**

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341 (sensible a Amoxicilina)
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 9993
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 (sensible a Cloranfenicol)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Proteus vulgaris</i>	

Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el Cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química

## **4.2 METODOLOGÍA**

### **4.2.1 MÉTODO DE BAUER-KIRBY MODIFICADO**

#### **4.2.1.1 PREPARACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS**

Cada solución derivada del albendazol con una concentración de 5000µg/ml, se esterilizó por filtración utilizando unidades de filtración Millex-GV (Millipore Cat. No SLGVO33RS) de 0.22µm de diámetro de poro, el mismo día que se realizó la prueba.

#### **4.2.1.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO Y SIEMBRA DE CAJAS**

A partir de cultivos de 24 horas de cada microorganismo en medio Muller – Hinton, con un asa bacteriológica se tomaron de 3 a 5 colonias y se depositaron dentro de un matraz nefelométrico que contenía 50ml de SSI, se agitaron hasta disgregar totalmente las colonias en la solución. Posteriormente se les midió la turbidez en un nefelómetro

marca Klett y se ajusto la concentración hasta alcanzar una turbidez de 15 unidades (UK) equivalentes a 0.06 en la escala de Mac Farland.

En placas de agar Muller- Hinton, previamente preparadas y mantenidas a temperatura ambiente durante 30min, se depositó con una micropipeta 0.1ml de inóculo ajustado. El inóculo se distribuyó de manera homogénea sobre la superficie del agar, estriando con ayuda de un asa y girando las cajas 60° en cada ocasión.

#### **4.2.1.3 COLOCACIÓN DE LOS DISCOS**

En área estéril, se procedió a colocar con las pinzas de disección, previamente esterilizadas, 6 discos de papel en cada placa, a una distancia entre 15 y 20mm del perímetro de la caja. Dentro del gabinete de seguridad y utilizando una micropipeta, se impregnó cada disco de papel con 5µl de las soluciones de los derivados del albendazol, previamente preparados. Cada solución se probó por duplicado en cada caja, los discos se intercalaron entre ellos con la finalidad de no tener la misma concentración en dos discos continuos.

#### **4.2.1.4 INCUBACIÓN Y LECTURA**

Las placas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, se realiza la medición de los halos de inhibición utilizando un calibrador Vernier por las parte posterior de la cajas. Las sustancias que mostraron actividad antimicrobiana se probaron por el método de cilindros para obtener la CMI.

### **4.2.2 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON CILINDROS**

Este método se eligió debido a la similitud con el método modificado, además de ser el aceptado por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; en estudios de este tipo resulta poco práctico utilizarlo de entrada ya que la cantidad de sustancia que hay que

sintetizar para cada prueba es grande y el proceso resulta demasiado costoso. Es por ello que se propone la modificación como una prueba preeliminar, que nos arrojaría un criterio inicial para desechar aquellas sustancias que no posean actividad antimicrobiana.<sup>(28,29)</sup>

#### **4.2.2.1 PREPARACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS**

A partir de cada solución derivada del albendazol con concentración de 5000µg/ml, se realizaron diluciones con DMSO hasta obtener las concentraciones finales de: 1.6µg/ml, 2.5µg/ml, y 3.9µg/ml. Se esterilizaron por filtración utilizando unidades de filtración Millex-GV (Millipore Cat. No SLGVO33RS) de 0.22µm de diámetro de poro, el mismo día que se realizó la prueba.

#### **4.2.2.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

A partir de cultivos de 24 horas en medio Muller – Hinton se tomaron varias colonias y se depositaron en un matraz nefelométrico el cual contenía 50ml de SSI, se agitó hasta disgregar por completo las colonias en la solución. Posteriormente se midió la concentración en el nefelómetro *Klett* y se ajustó hasta alcanzar una concentración de 0.5 en la escala de Mac Farland, el cual fue utilizado para preparar la capa siembra.<sup>(29)</sup>

#### **4.2.2.3 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS**

Se preparó, esterilizó y vació en cajas Petri de 14 – 16ml el Agar Muller-Hinton, el vaciado del medio se llevó acabo cuando tenía una temperatura aproximada de 48 a 50°C, se dejó solidificar.

Del inóculo ajustado se tomaron con una micropipeta 0.7ml por cada 100 ml de medio Muller – Hinton, previamente preparado y conservado a una temperatura de 50°C. Se

---

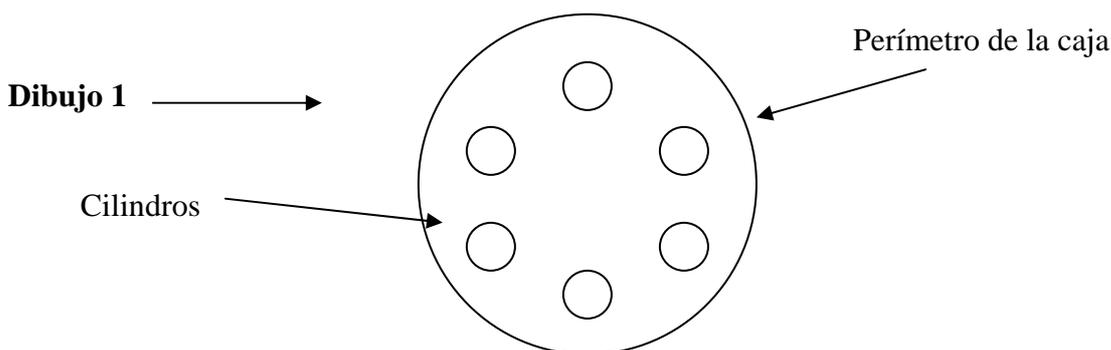
(28) Code of Federal Regulations., 1990.

(29) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., 2000.

depositaron de 5 a 6 ml de este medio inoculado en las placas previamente preparadas con la capa base, cuidando de cubrir por completo y se dejaron solidificar las cajas con la tapa entreabiertas para evitar la condensación de agua.

#### 4.2.2.4 COLOCACIÓN DE LOS CILINDROS

En área estéril se depositaron con las pinzas de disección, previamente esterilizadas, 6 cilindros en la placa (ver dibujo1) a una distancia de 15 a 20 mm del perímetro de la caja hacia el centro de la misma. Con una micropipeta, a cada cilindro se le adicionaron 100  $\mu$ l de las soluciones de los derivados del albendazol. Cada solución se probó por duplicado en cada caja, en las cuales los cilindros fueron intercalados entre ellos con la finalidad de no tener la misma concentración en dos cilindros continuos.



#### 4.2.2.5 INCUBACIÓN Y LECTURA

Las placas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37°C, posteriormente se realizó la medición de los halos de inhibición con el calibrador Vernier por la parte posterior de la caja, quitando previamente los cilindros con ayuda de las pinzas de disección en área estéril <sup>(30)</sup> .

---

(30) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2000.

#### 4.2.2.6 CONTROLES

El control de cloranfenicol se preparó disolviendo 10mg de cloranfenicol en 10ml de alcohol y se aforo a 100ml con agua destilada. Se tomó 1ml de ésta solución y se aforo a 10ml con agua destilada para obtener la solución madre con una concentración de 10µg/ml para, posteriormente, realizar las diluciones de esta solución con agua destilada estéril hasta obtener las concentraciones de 1.6 µg/ml, 2.0 µg/ml, 2.5 µg/ml, 3.1 µg/ml, y 3.9 µg/ml.

Para preparar el control de amoxicilina, se preparó una solución buffer de fosfatos 0.1M, pH 6; con 30ml de ésta solución se disolvieron 10mg de amoxicilina y se aforo hasta 100ml con la misma solución. Se tomó 1ml de esta solución y se aforo con el buffer a 10ml para obtener una solución madre con una concentración de 10µg/ml, de esta solución se realizaron las diluciones con el mismo buffer de fosfatos, hasta obtener las concentraciones de 0.125 µg/ml, 0.156 µg/ml, 0.195 µg/ml, 0.243 µg/ml, y 0.303 µg/ml. Las soluciones de los controles no necesitaron ser esterilizadas ya que la contaminación de estas es poco frecuente.<sup>(31)</sup> En cada cilindro se colocó un volumen de 100µl.

En cada caja se colocaron 3 cilindros con la concentración media de cada solución control. Para el caso de Cloranfenicol se utilizó la de 2.5µg/ml y para Amoxicilina la de 0.195 µg/ml; en los 3 cilindros restantes se colocó una de las concentraciones restantes de cada control por lo que en cada caja se deberán tener 3 lecturas de la concentración media y 3 lecturas de cada una de las 4 concentraciones restantes. Por cada concentración se colocaron 3 cajas de tal forma que al final se obtengan 36 lecturas de la concentración media y 9 lecturas por cada concentración restante.

Después se incubaron durante 24 horas a 37°C y se obtuvieron las lecturas del diámetro del halo de inhibición en mm y posteriormente se obtuvo el promedio para cada una de las 4 concentraciones. Ver **Tabla 4 y 5** en el apartado de resultados.

---

(31) Code of Federal Regulations. 1990

## 5.0 RESULTADOS

Los resultados mostrados a continuación nos permiten evaluar la sensibilidad y la confiabilidad del método de Bauer – Kirby modificado a diferentes concentraciones de trabajo con lo cual podemos evaluar qué tan conveniente es utilizar esta como prueba previa a un análisis más detallado.

Los datos de los halos de inhibición obtenidos y mostrados a continuación fueron clasificados en tres categorías: Sensible(S), Media (M), y Resistente (R) <sup>(32)</sup>. Debe tomarse en cuenta el microorganismo que se este utilizando, ya que de esto dependerá la clasificación del resultado, debido a que en ocasiones aún obteniendo un halo de inhibición cuando es muy pequeño, este dato puede tomarse como resistencia del microorganismo al antimicrobiano. Por esta causa se sugiere ver los rangos de aceptación y clasificación de cada microorganismo en la bibliografía. <sup>(33)</sup>

---

(32) NCCLS. Performance Standards For antimicrobial Disk. 2000.

(33) Bauer A.W., Kirby W.M.M., 1966.

**TABLA 1.- COMPUESTOS QUE RESULTARON POSITIVOS POR EL MÉTODO MODIFICADO DE BAUER- KIRBY**

Sensible = (S)

Resistente = (R)

Compuestos		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
(1)	[Co(bz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	R	R	S	R	S	R
(2)	[Co(bz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	S	S
(3)	[Co(bz)(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(4)	[Zn(bz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(5)	[Zn(bz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(6)	[Zn(bz) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O	R	R	R	R	R	R
(7)	[Co(2ab) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	R	R	R	S	R	S
(8)	[Co(2ab) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(9)	Co(2ab)(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	R	R	R	R	R	R
(10)	[Zn(2ab) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	R	S	R	R	S	R
(11)	[Zn(2ab) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(12)	[Zn(2ab) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(13)	[Co(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] 2H <sub>2</sub> O*	S	R	S	R	S	R
(14)	[Co(abz) Br <sub>2</sub> ] 3H <sub>2</sub> O*	R	R	R	R	S	R
(15)	[Co(abz) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] H <sub>2</sub> O*	R	R	S	R	R	R
(16)	[Zn(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 3H <sub>2</sub> O	R	S	R	R	R	R
(17)	[Zn(abz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 2H <sub>2</sub> O	R	R	R	R	S	R
(18)	[Zn(abz) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	R	R	R	R	R	R
(19)	[Co(ntb)Cl] Cl 2H <sub>2</sub> O	S	S	R	S	S	R
(20)	[Co(ntb)Br] Br 2H <sub>2</sub> O	S	R	S	S	S	R
(21)	[Co(ntb)NO <sub>3</sub> ] NO <sub>3</sub>	R	R	S	R	R	R
(22)	[Zn(ntb)Cl] <sub>2</sub> [ZnCl <sub>4</sub> ].4EtOH	S	R	S	S	S	R
(23)	[Zn(ntb)Br] <sub>2</sub> [ZnBr <sub>4</sub> ]	S	S	S	R	S	R
(24)	[Zn(ntb)NO <sub>3</sub> ] NO <sub>3</sub> [Zn(ntb)(H <sub>2</sub> O)] 2NO <sub>3</sub>	S	S	S	R	S	R

**Tabla 2 RESULTADOS DE LOS ANTIMICROBIANOS POSITIVOS EN EL MÉTODO DE BAUER – KIRBY MODIFICADO, PRBADOS CON EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON CILINDROS.**

**N.I= No hay inhibición**

<b>Compuesto</b>		<b><i>M.luteus</i> ATCC 9341</b>	<b><i>E.coli</i> ATCC 25922</b>
		Resultado	Resultado
<b>(1)</b>	[Co(bz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	R	S
<b>(2)</b>	[Co(bz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	R	S
<b>(10)</b>	[Zn(2ab) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	S	S
<b>(13)</b>	[Co(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] 2H <sub>2</sub> O	R	S
<b>(14)</b>	[Co(abz) Br <sub>2</sub> ] 3H <sub>2</sub> O	R	S
<b>(16)</b>	[Zn(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 3H <sub>2</sub> O	S	R
<b>(17)</b>	[Zn(abz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 2H <sub>2</sub> O	R	S
<b>(19)</b>	[Co(ntb)Cl] Cl 2H <sub>2</sub> O	S	S
<b>(20)</b>	[Co(ntb)Br] Br 2H <sub>2</sub> O	R	S
<b>(22)</b>	[Zn(ntb)Cl] <sub>2</sub> [ZnCl <sub>4</sub> ]. 4EtOH	R	S
<b>(23)</b>	[Zn(ntb)Br] <sub>2</sub> [ZnBr <sub>4</sub> ]	S	S
<b>(24)</b>	[Zn(ntb)NO <sub>3</sub> ] NO <sub>3</sub> [Zn(ntb) (H <sub>2</sub> O)] 2NO <sub>3</sub>	S	S
<b>Amoxicilina</b>		S	
<b>Cloranfenicol</b>			S

**Tabla 3.- RESULTADOS COMPARATIVOS DE LOS COMPUESTOS PROBADOS POS LOS DOS MÉTODOS**

Antimicrobiano	<i>E.coli</i>			<i>M.luteus</i>		
	Conc	Discos	Cilindros	Conc.	Discos.	Cilindros.
(1) [Co(bz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	1.6 µg/ml	R	S	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	R	S	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	M	S	3.9 µg/ml	R	R
(2) [Co(bz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	1.6 µg/ml	M	M	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	M	M	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	M	S	3.9 µg/ml	R	R
(10) [Zn(2ab) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	1.6 µg/ml	R	R	1.6 µg/ml	R	M
	2.5 µg/ml	R	R	2.5 µg/ml	R	M
	3.9 µg/ml	R	M	3.9 µg/ml	M	M
(13) [Co(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] 2H <sub>2</sub> O	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	R	M	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	R	S	3.9 µg/ml	R	R
(14) [Co(abz)Br <sub>2</sub> ] 3H <sub>2</sub> O	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	R	M	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	R	M	3.9 µg/ml	R	R
(16) [Zn(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 3H <sub>2</sub> O	1.6 µg/ml	R	R	1.6 µg/ml	R	M
	2.5 µg/ml	R	R	2.5 µg/ml	R	M
	3.9 µg/ml	R	R	3.9 µg/ml	M	M

**Tabla 3 ( Continuación)**

Antimicrobiano	<i>E.coli</i>			<i>M.lutetus</i>		
	Conc	Discos	Cilindros	Conc.	Discos.	Cilindros
(17) [Zn(abz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 2H <sub>2</sub> O	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	R	M	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	M	M	3.9 µg/ml	R	R
Ntb	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	M
	2.5 µg/ml	M	M	2.5 µg/ml	R	M
	3.9 µg/ml	M	S	3.9 µg/ml	M	M
(19) [Co(ntb)Cl] Cl 2H <sub>2</sub> O	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	M
	2.5 µg/ml	M	M	2.5 µg/ml	R	M
	3.9 µg/ml	M	S	3.9 µg/ml	R	M
(20) [Co(ntb)Br] Br 2H <sub>2</sub> O	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	M	M	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	M	S	3.9 µg/ml	R	R
(22) Zn(ntb)Cl] <sub>2</sub> [ZnCl <sub>4</sub> ]. 4EtOH	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	R
	2.5 µg/ml	R	M	2.5 µg/ml	R	R
	3.9 µg/ml	R	M	3.9 µg/ml	R	R
(23)[Zn(ntb)Br] <sub>2</sub> [ZnBr <sub>4</sub> ]	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	M
	2.5 µg/ml	R	M	2.5 µg/ml	R	M
	3.9 µg/ml	R	S	3.9 µg/ml	M	S
(24) [Zn(ntb) NO <sub>3</sub> ] NO <sub>3</sub> [Zn(ntb) (H <sub>2</sub> O)] 2NO <sub>3</sub>	1.6 µg/ml	R	M	1.6 µg/ml	R	M
	2.5 µg/ml	R	M	2.5 µg/ml	R	M
	3.9 µg/ml	M	S	3.9 µg/ml	M	S

## TABLAS DE LOS CONTROLES

**Tabla 4 RESULTADOS OBTENIDOS CON *Escherichia coli* y CLORANFENICOL**

- **Curva estándar con penicilindros**

Diámetros obtenidos en mm para las diferentes concentraciones								
1.6µg/ml	2.5µg/ml	2.0µg/ml	2.5µg/ml	3.1µg/ml	2.5µg/ml	2.5µg/ml	2.5µg/ml	
10	19	13	17	22	20	24	16	
12	20	14	18	19	16	23	16	
12	19	13	18	22	17	24	19	
11	18	14	17	20	17	24	19	
10	19	16	19	21	19	23	16	
12	17	14	17	21	17	24	17	
13	17	14	-	21	-	24	19	
11	19	-	-	-	-	25	18	
-	-	-	-	-	-	-	-	
Promedio	11.3	18.5	14.0	17.66	20.85	17.8	23.87	17.5

**Tabla 5: RESULTADOS OBTENIDOS CON *Micrococcus luteus* y AMOXICILINA**

- **Curva patrón**

Diámetros obtenidos en mm para las diferentes concentraciones								
0.125 µg/ml	0.195 µg/ml	0.156 µg/ml	0.195 µg/ml	0.243 µg/ml	0.195 µg/ml	0.303 µg/ml	0.195 µg/ml	
11.2	13.0	12.6	13.7	13.9	12.9	15.5	13.7	
10.0	13.4	12.5	13.8	13.8	13.2	15.3	13.6	
10.0	13.9	12.7	13.7	14.2	13.5	15.5	13.7	
9.0	12.3	13.0	13.6	14.3	13.2	15.5	13.4	
11.1	13.8	11.9	13.8	14.3	13.0	15.2	13.5	
11.3	13.7	11.6	13.7	14.1	13.3	15.6	13.3	
11.3	14.0	11.9	13.3	14.4	12.9	15.4	13.8	
11.0	13.9	12.8	13.7	14.4	13.3	16.2	13.7	
10.0	13.8	-	-	14.3	13.9	15.7	13.9	
Promedio	10.54	13.53	12.375	13.6	14.18	13.24	15.54	13.62

**Nota:** Los estándares fueron probados también dentro de las cajas junto con los antimicrobianos.

## 6.0 Discusión de Resultados

De los resultados obtenidos por el método de Bauer – Kirby modificado (**Tabla 1**) podemos observar que con respecto a los compuestos formados por el ligante **bz**, sólo los compuestos  $[\text{Co}(\text{bz})_2 \text{Cl}_2]$  y  $[\text{Co}(\text{bz})_2 \text{Br}_2]$  tuvieron actividad inhibitoria sobre las cepas *S. typhi* y *P. vulgaris* respectivamente y ambos sobre *E.coli*. se observa que los compuestos formados con este ligante y coordinados con Zn y  $\text{NO}_3^-$  no tienen actividad sobre las cepas utilizadas. Los compuestos formados con el ligante **2ab**,  $[\text{Co}(2\text{ab})_2 \text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(2\text{ab})_2 \text{Cl}_2]$  muestran actividad inhibitoria para las cepas de *P. aeruginosa* y *P. vulgaris*, el primero y sobre *M.luteus*, y *E.coli* el segundo y aquellos que estan coordinados con  $\text{Br}_2$  y  $\text{NO}_3^-$  no muestran actividad.

Entre los compuestos que tienen como ligante **abz**, los que tuvieron actividad con alguna de las cepas son:  $[\text{Co}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{abz})_2 \text{Br}_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{abz})_2(\text{NO}_3)_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{abz})_2 \text{Br}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , solo el compuesto  $[\text{Zn}(\text{abz})_2(\text{NO}_3)_2]$  no presento actividad sobre ninguna de las cepas. El compuesto  $[\text{Co}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , fue el que presento una mayor actividad inhibitoria, ya que las cepas de *S.aureus*, *S. typhi* y *E.coli* resultaron sensibles.

Con respecto a los compuestos formados con el ligante **ntb** se observó que el ligante sin algún otro metal coordinado tiene actividad por lo menos sobre algunas de las cepas, por lo tanto los resultados obtenidos muestran que todos los compuestos coordinados tienen una mayor actividad inhibitoria. Debemos mencionar que incluso el compuesto coordinado con  $\text{NO}_3^-$  tiene actividad inhibitoria, lo cual no había sucedido con los demás ligantes.

Con estos resultados fue posible hacer una selección de los derivados del albendazol que mostraron actividad antimicrobiana para comparar el método planteado con el recomendado por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Los resultados observados en la Tabla 2, demuestra que los compuestos:  $[\text{Co}(\text{bz})_2 \text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Co}(\text{bz})_2 \text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(2\text{ab})_2 \text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Co}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{abz}) \text{Br}_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{abz})_2 \text{Br}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Br}]\text{Br} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{Cl}]_2 [\text{ZnCl}_4] \cdot 4\text{EtOH}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{Br}]_2 [\text{ZnBr}_4]$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{NO}_3] \text{NO}_3$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb}) (\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{NO}_3$ , muestran una actividad inhibitoria sobre la cepa de *E.coli*, en cambio sobre la cepa de *M. luteus* solo tienen actividad inhibitoria los siguientes compuestos:  $[\text{Zn}(2\text{ab})_2 \text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{Br}]_2 [\text{ZnBr}_4]$  y  $[\text{Zn}(\text{ntb}) \text{NO}_3] \text{NO}_3$   $[\text{Zn}(\text{ntb}) (\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{NO}_3$  con esto podemos afirmar que a concentraciones bajas los compuestos restantes no tienen actividad sobre esta cepa

Los resultados de la **Tabla 3** muestran que bajo las mismas condiciones, usando el método modificado hay compuestos que no tienen actividad o bien la tienen a partir de la segunda concentración ( $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y en algunos casos en la concentración mas elevada que fue de ( $3.9\mu\text{g}/\text{ml}$ ); mientras que por el método de cilindro placa presentan actividad a partir de la primera concentración ( $1.6\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Para el caso de la cepa de *E.coli*, los que muestran este comportamiento son:  $[\text{Co}(\text{bz})_2 \text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(2\text{ab})_2 \text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Co}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{abz}) \text{Br}_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{abz}) \text{Br}_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{abz})_2 \text{Br}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ntb, )  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Br}]\text{Br} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{Cl}]_2 [\text{ZnCl}_4] \cdot 4\text{EtOH}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{Br}]_2 [\text{ZnBr}_4]$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb}) \text{NO}_3] \text{NO}_3$   $[\text{Zn}(\text{ntb}) (\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{NO}_3$ . Para la cepa de *M.lutteus* los compuestos que mostraron el mismo comportamiento fueron:  $[\text{Zn}(2\text{ab})_2 \text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{abz})_2 \text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb})\text{Br}]_2 [\text{ZnBr}_4]$ ,  $[\text{Zn}(\text{ntb}) \text{NO}_3] \text{NO}_3$   $[\text{Zn}(\text{ntb}) (\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{NO}_3$

Por lo que se observa que los compuestos que muestran actividad inhibitoria en el método modificado lo hacen en su mayoría a partir de la concentración más elevada(3.9µg/ml), en cambio la actividad que se muestra por el método de cilindro placa en la mayoría de los casos es a partir de la concentración mas baja(1.6µg/ml). Por lo tanto, el método modificado no tiene una sensibilidad comparable al método de difusión en agar esto se debe a la cantidad de antimicrobiano que se utiliza en uno y otro;para cilindro placa 100µl y para el metodo modificado 5µl.

La actividad inhibitoria que presentan los derivados del albendazol utilizados en este trabajo se presenta a concentraciones relativamente bajas; esto se puede afirmar debido a que en trabajos reportados en la literatura<sup>(34),(35),(36)</sup>, en los que se estudian compuestos derivados del benzimidazol coordinados con Fe<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup>, Zn<sup>II</sup> y Ag<sup>I</sup> la actividad antimicrobiana se observa a concentraciones mayores(en algunos casos a partir 9µg/ml hasta 5000µg/ml, en otros a partir de 600µg por disco ) a las utilizadas en este trabajo.

Con respecto a los controles se utilizo cloranfenicol y amoxicilina debido a que estos antibióticos son utilizados como control de sensibilidad para las cepas de *E.coli* y *M.luteus* respectivamente. Cabe mencionar que no hay referencias sobre la actividad de compuestos similares utilizados en este estudio, por lo cual se decidió usar como controles positivos estos dos antibióticos.

---

(34)S.H. Ali Abdelwahed. Afaf H. El-masry.,2000

(35) Tavman A. Ülküseven B., 2003

(36) Vera Klimosová. Jan K.2002

## **7.0 Conclusiones**

El método modificado de Bauer – Kirby es una prueba confiable a la concentración probada (5000 $\mu$ g/ml) y se puede utilizar como prueba preliminar, lo que permitiría ahorrar gran cantidad de muestra, costos y tiempo..

Sí este método se utiliza con concentraciones menores, podríamos obtener falsos negativos. Por lo que deberá someterse el mismo compuesto a una prueba más sensible como el método de cilindro placa, para corroborar el resultado inicial.

## 8.0 Anexos

### Anexo I Tablas

<b>Tabla 1. Solventes y diluyentes para antimicrobianos<sup>A</sup></b>		
<b>Antimicrobiano</b>	<b>SolventeB</b>	<b>Diluyente</b>
Amoxicilina Ticarcilina Acido clavulánico Sulbactam Cefepima	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M
Ampicilina	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M
Azitromicina Eritromicina	Alcohol	Medio de cultivo/Agua
Aztreonam	Solución saturada de CO <sub>3</sub> HNa	Agua
Cefixima	Agua (25mg/ml agua)+ CO <sub>3</sub> HNa	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M
Cefotetan	Dimetilsulfóxido	Agua
Cefpodoxima	Solución acuosa de CO <sub>3</sub> HNa 0,1%	Agua
Ceftazidima	CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> (10% del peso de Ceftazidima) en la mayor parte de agua necesaria; añadir ceftazidima y ajustar volumen final de agua	Agua
Cefalotina Cefazolina Cefuroxima Cefalexina	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M	Agua

Claritromicina	Metanol	Solución amortiguadora de fosfato pH 7.0, 0,1M
Cloranfenicol	Etanol 95%	Agua
Cinoxacino Acido nalidíxico	½ volumen de agua + NaOH 1M gota a gota hasta disolver	Agua
Enoxacino Fleoroxacino Norfloxacino Ofloxacino Levofloxacino	½ volumen de agua + NaOH 1M gota a gota hasta disolver	Agua
Imipenem	Solución amortiguadora de fosfato pH 7.2, 0,01M	Solución amortiguadora de fosfato pH 7.0, 0,01M
Moxalactam (sal sódica)	CIH 0,04M; dejar 1,5-2 horas	Solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, 0,1M
Nitrofurantoína	Solución amortiguadora de fosfato pH 8.0, 0,01M	Solución amortiguadora de fosfato pH 8.0, 0,01M
Rifampicina	Metanol	Agua (con agitación)
Sulfamidas	½ volumen de agua caliente + mínima cantidad de NaOH 2,5M	Agua
Teicoplanina	Solución amortiguadora de fosfato pH 7.0, 0,1M	Solución amortiguadora de fosfato pH 7.0, 0,1M
Trimetoprim	CIH o ácido láctico 0,05M (10% del volumen final)	Agua (calentar si es necesario)

<sup>A</sup> cuando se utilicen sustancias valoradas procedentes de compañías farmacéuticas deben emplearse los solventes/diluyentes indicados por las mismas

<sup>B</sup> puede usarse agua como solvente y diluyente para: amikacina, azlocina, carbenicilina, cefaclor, cefamandol, cefmetazol, cefonicid, cefotaxima, cefoperazona, cefoxitina, ceftizoxima, ceftriaxona, ciprofloxacino, clindamicina, espectinomocina, gentamicina, kanamicina, meticilina, mezlocilina, nafcilina, netilmicina, oxacilina, penicilina G, piperacilina, tetraciclina, tobramicina, vancomicina.

<b>Tabla 2. Almacenamiento de soluciones reconstituidas concentradas (10-300 mg/ml) de antimicrobianos</b>			
<b>Antimicrobiano</b>	<b>-20°C</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
Amikacina (sulfato)	>36 meses	>36 meses	36 meses
Ampicilina (sódica, 20 mg/ml)	92-96% 24 h	97%, 24h	85-92%, 24 horas
Carbenicilina (sódica)	1 mes	6 días	80%, 3 días
Cefazolina (sódica)	3 meses	14 días	90-92%, 4 días
Cefoxitina (sódica)	8 meses	26 días	33-34 horas
Cefalotina (sódica)	6 semanas	4 días	12 horas
Cefotaxima (sódica)	>3 meses	10 días	24 horas
Clindamicina (fosfato)	>1 mes	32 días	16 días
Gentamicina (sulfato)			2 años
Meticilina (sódica)	1 mes	4-24 días	24 horas
Nafcilina (sódica)	3-9 meses	7 días	3 días
Oxacilina (sódica)	3 meses	7 días	3 días
Penicilina G (potásica)	3 meses	7 días	3 días
Tetraciclina (clorhidrato)	>1 mes		12-24 horas
Ticarcilina (sódica)	>1 mes	91%, 7 días	93%, 24 horas 63%, 3 días
Tobramicina (sulfato)	>3 meses	4 días	24 horas

**Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias<sup>a</sup> y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC25922 empleada como control de calidad**

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo <sup>b</sup>
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Ampicilina <sup>a,c</sup>	10	≤13	14-16	>17	≥32	<8	16-22
	Cefalotina <sup>c,d</sup>	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	15-21
	Cefazolina <sup>c,d</sup>	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Gentamicina <sup>c</sup>	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18	≥16/8	≤8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	25-29
	Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤64	23-29
	Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	24-30
	Piperacilina	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	24-30
	Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	26-32
	Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23	≥32	≤4	20-26
	Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21	≥8	≤2	23-28
	Cefixima	5	≤15	16-18	≥19	≥4	≤1	23-27
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	28-34
	Cefmetazol	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	26-32
	Cefoperazona <sup>a</sup>	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	28-34
	Cefotaxima <sup>a,d</sup>	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	29-35
Ceftizoxima <sup>a</sup>	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	30-36	

	Ceftriaxona <sup>a, d</sup>	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	29-35
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	29-35
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	26-32
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	28-34
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	19-26
	Ciprofloxacino <sup>a, c</sup>	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	30-40
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	29-37
	Trimetoprim/ sulfametoxazol <sup>a, c</sup>	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32
C	Ceftazidima <sup>e</sup>	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-32
	Aztreonam <sup>e</sup>	30	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8	28-36
	Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18	≥25	≤6	17-25
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	22-30
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	18-26
	Tetraciclina <sup>c</sup>	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	18-25
	Cloranfenicol <sup>a</sup>	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	21-27
D	Carbenicilina	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	23-29
	Cinoxacino	100	≤14	15-18	≥19	≥64	≤16	26-32
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	--
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	28-35
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	29-33
	Loracarbef <sup>f</sup>	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	20-25
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	15-23
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	21-28
	Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64	22-30

Elaborado con datos del NCCLS, 2000

a) Para aislamientos de *Salmonella* y *Shigella* spp. debemos ensayar e informar rutinariamente solo ampicilina, una quinolona, y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, el cloranfenicol y cefalosporinas de tercera generación deben ser estudiadas e informadas para *Salmonella* aisladas como causa de infecciones extraintestinales.

b) Además de *E. coli* ATCC25922, estudiar *E. coli* ATCC 35218 cuando se ensayan combinaciones con inhibidores de β-lactamasa. Los intervalos aceptables para *E. coli* ATCC 35218 son los

siguientes: amoxicilina/ácido clavulánico de 18 a 22 mm; ampicilina/sulbactam, de 13 a 19 mm; ticarcilina/ácido clavulánico de 21 a 25 mm y piperacilina/tazobasctam, de 24 a 30 mm.

c) Puede además ser apropiado para obtener información sobre cepas aisladas del tracto urinario, junto con antimicrobianos del grupo D.

d) Cefalotina representa a cefapirina, cefradine, cefalexina, cefaclor y cefadroxilo. Cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozil y loracarbef deben ser ensayados individualmente ya que pueden ser activos aunque la cefalotina no lo sea.

e) Cepas de *Klebsiella* spp. y *E. coli* pueden ser resistentes a cefalosporinas y aztreonam mediante producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido: a pesar de la aparente sensibilidad "in vitro", algunas cepas pueden ser reconocidas por resultados intermedios o resistentes a ceftazidima y aztreonam (o cefotaxima, cefpodoxima, ceftriaxona y ceftizoxima) y frecuentemente son resistentes a otros antimicrobianos como aminoglicósidos y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas con  $\beta$ -lactamasas de espectro-extendido deben ser informadas como resistentes a las cefalosporinas y al aztreonam.

f) Ciertas cepas de *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter* spp. pueden presentar resultados falsamente sensibles con discos de loracarbef, por lo que los aislamientos de estos géneros no deben ser ensayados frente a este antimicrobiano.

**Tabla 4. Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.<sup>a</sup>, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 empleada como control de calidad**

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI(µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Intervalo <sup>b</sup>
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Mezlocilina <sup>b</sup> <i>Pseudomonas</i> spp	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	--
	Mezlocilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	≤15	--	≥16	>128	≤64	19-25
	Ticarcilina <sup>b</sup> <i>Pseudomonas</i> spp.	75	≤14	--	≥15	≥128	≤64	22-28
	Ticarcilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	--
	Piperacilina <sup>b</sup> <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤17	--	≥18	≥128	≤64	25-33
	Piperacilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	--
	Ceftazidima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	22-29
	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	16-21
B	Amp./sulbact. <i>Acinetobacter</i> spp.	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	--
	Ticar./clav. <i>Pseudomonas</i> spp.	75/10	≤14	---	≥15	≥128/2	≤64/2	20-28
	Ticar./clav. <i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	---
	Piper./tazob. <i>Pseudomonas</i> spp.	100/10	≤17	---	≥18	≥128/4	≤64/4	25-33
	Piper./tazob. <i>Acinetobacter</i>	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	---

	spp.							
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	24-30
	Cefoperazona	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	23-29
	Aztreonam	30	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8	23-29
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	27-33
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	20-28
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	18-26
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-25
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	25-33
C	Cefotaxima	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	18-22
	Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	17-23
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	17-23
	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	--
	Trimetoprim/ sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	--
D	Carbenicilina <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤13	14-16	≥17	≥512	≤128	18-24
	Carbenicilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	--
	Ceftizoxima	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	12-17
	Tetraciclina <sup>c</sup>	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	--
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	22-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	19-26
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	22-29
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	17-21
	Sulfisoxazol <sup>d</sup>	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	--

Elaborado con datos del NCCLS, 2000

a) Otras bacterias no pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* deben ser ensayadas por un método de dilución.

b) Tratar las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes granulocitopénicos y las infecciones graves en otros pacientes con dosis máximas de penicilinas antipseudomonas (ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina), o ceftazidima en combinación con un **aminoglicósido**.

**Tabla 5. Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad.**

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µ/µml)		S. aureus ATCC 25923 intervalo <sup>a</sup>
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G <sup>b,c</sup>	10 U	≤28	--	>29	β-lactamasa <sup>b</sup>	≤0.1	26-37
	Oxacilina <sup>b</sup> ( <i>S. aureus</i> )	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2	18-24
	( <i>Estafilococcus coagulasa</i> -)	1	≤17	--	≥18	≥0.5	≤0.25	--
B	Vancomicina <sup>d</sup>	30	--	--	≥15	≥32	≤4	17-21
	Teicoplanina	30	≤11	11-13	≥14	≥32	≤8	15-21
	Eritromicina <sup>e</sup>	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina <sup>e</sup>	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina <sup>e</sup>	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	21-26
	Clindamicina <sup>e</sup>	2	≤14	15-20	≥21	≥4	≤0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	25-30
	Cloranfenicol <sup>e</sup>	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina <sup>e,f</sup>	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina <sup>f,g</sup>	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

- a) Además de *S. aureus* ATCC 25923, ensayar *E. coli* ATCC 35218 con: amoxicilina/clavulánico de 18 a 22 mm.; ampicilina/sulbactam de 13 a 19 mm.
- b) Las cepas resistentes de *S. aureus* producen  $\beta$ -lactamasa, y para estas pruebas es preferible el empleo de discos de penicilina G de 10 U. Utilizar penicilina G para estudiar la sensibilidad de todos los estafilococos a todas las penicilinas sensibles a la penicilinasa.
- c) Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos (la sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos se puede deducir estudiando solo penicilina y oxacilina).
- d) Todos los estafilococos con un diámetro del halo de inhibición igual o menor de 14mm deben ser estidados para determinar la CMI de la vancomicina.
- e) No para microorganismos aislados del tracto urinario.
- f) No utilizar rifampicina sola para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.
- g) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

**Tabla 6. Patrones estándar de inhibición y punto de corte equivalente a la CMI para enterococos <sup>a</sup>**

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición			Punto de corte Equivalente a la CMI (µ/ml)	
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible
A	Penicilina <sup>b</sup>	10 U	<14	--	>15	≥16	≤8
	Ampicilina <sup>b</sup>	10	≤16	--	≥17	≥16	≤8
B	Vancomicina <sup>c</sup>	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤4
	Teicoplanina	30	≤10	11-13	≥14	≥32	≤8
C	Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5
	Gentamicina <sup>d</sup>	120	6	7-9 <sup>e</sup>	≥10	≥500	≤500
	Estreptomicina <sup>d</sup>	300	6	7-9 <sup>e</sup>	≥10	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>
D	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32
	Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
	Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64

Elaborado con datos del NCCLS, 2000 .

a) Puede usarse *S. aureus* ATCC 25923 como control de calidad de los antimicrobianos de la tabla.

b) La sensibilidad a penicilina G puede servir para predecir la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, acilampicilinas, ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico, a los cuales los enterococos no productores de β-lactamasa son moderadamente sensibles. La terapia combinada con penicilina G o ampicilina más un aminoglicósido habitualmente está indicada para infecciones enterocócicas graves, tales como endocarditis. Para cepas aisladas de sangre y LCR se recomienda además una prueba de β-lactamasa.

c) Frecuentemente se utiliza vancomicina para infecciones enterocócicas graves en alérgicos a penicilina y debe informarse de forma selectiva sólo en tales pacientes. La terapia combinada con vancomicina más un aminoglicósido está habitualmente indicada en infecciones enterocócicas graves, como endocarditis. Cuando se valore vancomicina frente a enterococos, las placas deben mantenerse durante 24 h. y examinarse por luz transmitida; la presencia de una fina película o de algún crecimiento dentro de la zona de inhibición indica resistencia. Si la vancomicina se considera para el tratamiento de enfermedades enterocócicas graves, los microorganismos con zonas intermedias deben estudiarse por un método de CMI.

## Anexo II

### Métodos Comerciales

#### MÉTODO DE ATB STAPH (ANTIBIOGRAMA PARA ESTAFILOCOCOS)

Esta metodología permite determinar la sensibilidad de los estafilococos a los antibióticos en medios semi-sólidos, en condiciones muy cercanas a las de la técnica de dilución en agar.

Las galerías ATB STAPH incluyen 16 pares de cúpulas, el primero se utiliza sin antibiótico como control, las siguientes 14 contienen antibiótico en una o dos concentraciones. (c y C)

El microorganismo a analizar, se utiliza en suspensión con una turbidez equivalente al patrón 2 de Mac Farland, luego se transfiere al medio de cultivo Muller – Hinton, y se inocula en la galería por medio de una pipeta electrónica ATB una cantidad de 135µl. Posteriormente se incubará de 18 – 24 horas a una temperatura adecuada, después de transcurrido el tiempo la lectura se realiza de forma visual buscando turbidez para tener un resultado positivo o con el sistema ATB o mini API que dan la lectura automáticamente. El resultado obtenido puede clasificar a la cepa como Sensible, Intermedio o Resistente, esto se muestra en la siguiente tabla.

Aspecto de las cúpulas		Resultado		La cepa es:
c	C	c	C	
Transparente	Transparente	-	-	S Sensible
Turbio	Transparente	+	-	I Intermedia
turbio	turbio	+	+	R Resistente

Nota: para los antibiótico de una sola concentración solo se tiene si es sensible (-) ó resistente (+).

## MÉTODO DEL EPSION TEST (E-test)

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia)<sup>(37)</sup> mediante lectura directa podemos determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculada la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

En contra de lo que ocurre en la difusión en disco donde la orientación del disco no importa, si colocamos la tira al revés no se observa elipse de inhibición ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. El E-test se ha utilizado para determinar la CMI de diversos antibióticos en una amplia gamma de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium* spp., estreptococos nutricionalmente deficientes, enterococos con resistencia elevada a aminoglicósidos.

En algunos casos como vancomicina y *S. pneumoniae*, la CMI es más alta utilizando el E-test que la obtenida por los métodos de microdilución, produciendo resultados que se encuentran en el rango superior de aislamientos susceptibles y con resultados de control de calidad por encima de los límites aceptables.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CMI.

---

(37) Berke, J., Tierno, P., 1996.

Las tiras de E-test. deben almacenarse a -20°C. Es importante tener en cuenta la fecha de caducidad. En todo momento las tiras de E-test deben estar protegidas de la humedad. Antes de utilizar se deben atemperar a temperatura ambiente durante por lo menos 30 minutos.

#### Método

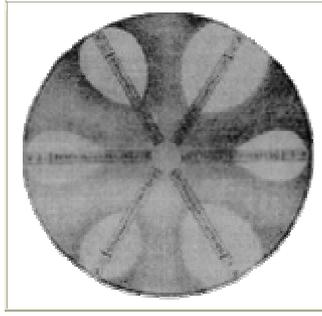
Utilizar también la misma metodología descrita en la técnica disco-placa. Dejar absorber el inóculo de 10 a 15 minutos para asegurarse que la superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tiras. Este punto es crítico para optimizar la realización del E-test.

#### Colocación de las tiras.

Tanto si se utiliza el colocador de las tiras como las pinzas, nos debemos asegurar que la escala de CMI está orientada hacia arriba y que la concentración máxima está cercana al extremo de la placa de Petri (Figura 1). Asegurarse que la tira contacta completamente con la superficie del agar. Si es necesario, eliminar las gotas de aire que puedan encontrarse por debajo de la tira presionándola ligeramente con las pinzas. Es importante no mover las tiras una vez que han sido colocadas en la superficie del agar ya que el antibiótico empieza a difundir rápidamente. Cuando se utiliza una placa de Petri de 100 mm depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, mientras que cuando se utiliza una placa de 150 mm no se deben colocar más de 6 tiras y siempre en la disposición que muestra la Figura 1.

#### Incubación.

Por regla general las placas son incubadas inmediatamente aunque pueden permanecer varias horas sin incubación sin que ello afecte significativamente en la determinación de la CMI. Sin embargo, los organismos exigentes deben ser incubados inmediatamente. La temperatura de incubación y la atmósfera utilizadas deben ser óptimas para el crecimiento de la especie bacteriana.



**Figura 1.- Método del Epsilon-test: Colocación de las tiras en la placa de 150 mm de diámetro**

Después del período de incubación, leer la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test. Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CMI se informará como superior al valor máximo de la escala de lectura y, por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe ser informado como inferior al valor mínimo de la escala de lectura. Con ciertas combinaciones de bacterias-antibióticos, el extremo de la elipse de inhibición puede ser difuso. Debemos mencionar una serie de consideraciones sobre la lectura de los resultados, a saber:

1. Cuando la CMI coincide entre dos marcas de la tira se informará el resultado correspondiente al valor superior.
2. Si se observan intersecciones diferentes del crecimiento bacteriano en ambas partes de la tira, debemos informar el valor de CMI más alto si la diferencia entre los dos valores no es superior a la mitad de un paso de dilución doble. Por ejemplo, si la CMI en un lado de la tira es 8 y en el otro es 12, deberemos informar 12. Sin embargo, si en un lado es 8 y en otro lado 16 debemos repetir la determinación.
3. Para *S. maltophilia* o *Enterococcus* spp., pueden aparecer colonias pequeñas en la zona de inhibición, por lo que se debe considerar como resistente.
4. Cuando se lea la intersección de la elipse con las tiras de sulfamidas, trimetoprim o cotrimoxazol, deberemos leer la intersección en la zona de crecimiento denso y no considerar la existencia de crecimiento en la zona poco densa.

5. Si se observan colonias grandes en la zona de inhibición puede representar un cultivo mixto o variantes resistentes. Debe repetirse el test a partir de colonias del cultivo primario. Si se observara el mismo patrón, se tienen que subcultivar las colonias que crecen en la zona de inhibición, identificarlas y volver a realizar el E-test. Si obtiene el mismo resultado y el cultivo es puro, se debe informar como resistente.
6. Utilizando los puntos de corte actuales para *S. pneumoniae* y penicilina una cepa que es resistente por el método de dilución en agar (CMI >2 µg/ml) puede ser categorizada como intermedia (CMI = 0,25 a 1,0 µg/ml) por E-test. En estos casos cuando encontramos una cepa con CMI de 1 µg/ml por el método E-test, se recomienda confirmar la CMI por un método alternativo.

Como se ha observado la interpretación de los resultados es mediante una relación directamente proporcional entre los valores de E-test y los valores de referencia de la NCCLS obtenidos por dilución en agar, los puntos de corte de la CMI serán apropiados para categorizar la bacteria estudiada como sensible, intermedia o resistente.

## Anexo III

### Síntesis de los compuestos derivados del albendazol

A continuación se describe brevemente la forma en que se llevo acabo la síntesis de compuestos de coordinación derivados del albendazol



Se pesaron 0.145 g, (0.5 mmol) de Nitrato de cobalto (II) hexahidratado y fue disuelto en 10ml alcohol caliente, posteriormente fue adicionado a una solución de 20 ml de alcohol donde se encontraba disuelto 0.118 g, (1 mmol) del ligante bz. Se obtuvo una solución de color violeta se puso a reflujo por 2 horas y se dejo en reposo por 2 semanas. El polvo violeta resultante fue filtrado, lavado con etanol y secado al vacío. Pureza: 71.5%. El análisis encontrado: C, 38.6; H, 3.4; N, 18.2%. Calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{CoN}_6\text{O}_7$ : C, 38.4; H, 3.2; N, 19.2%



Se pesaron 0.119 g, (0.5 mmol) de Cloruro de cobalto (II) hexahidratado se disolvieron en 10 ml de alcohol caliente y adicionaron a una solución la que contenía 0.067 g, (1 mmol) del ligante 2ab disuelto en 10ml de alcohol. Se obtuvo una solución azul que se calentó por 10 minutos y dejada en reposo por 2 semanas. El polvo azul resultante se filtro, lavo con alcohol y seco al vacío. Pureza: 71.0%. El análisis encontrado: C, 41.9; H, 3.7; N, 20.4%. Calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{CoN}_6\text{Cl}_2$ : C, 42.4; H, 3.6; N, 21.2%



Se pesaron 0.219 g, (1 mmol) de Bromuro de cobalto (II) se disolvio en 10 ml de alcohol caliente y se adiciono a una solución de 10 ml de etanol en el cual se encontraba disuelto 0.133 g, (1 mmol) del ligante 2ab. La solución azul obtenida fue calentada por 10 minutos y dejada en reposo por 2 semanas. El polvo azul-grisáceo resultante fue

filtrado, lavado con etanol y secado al vacío. Pureza: 23.0%. El análisis encontrado: C, 35.2; H, 2.9; N, 17.4%. Calculado para  $C_{14}H_{14}CoN_6Br_2$ : C, 34.6; H, 2.6; N, 17.3%



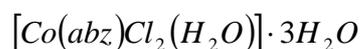
El procedimiento anterior fue repetido usando nitrato de cobalto (II) hexahidratado (0.291 g, 1 mmol) in 10ml, obteniendo un polvo violeta claro. Pureza: 27%. El análisis encontrado: C, 36.3; H, 3.8; N, 24.9%. Calculado para  $C_{14}H_{15}CoN_8O_{6.5}$ : C, 36.7; H, 3.3; N, 24.4%



Se peso 0.136 g, (1 mmol) de cloruro de zinc (II) el cual fue disuelto en 10ml de alcohol caliente y se adiciono a una solución de 2ab (0.067 g, 0.5 mmol) disuelto en 10ml de etanol La solución blanca obtenida fue calentada por 10 minutos y evaporada obteniendo un polvo blanco. Pureza: 68.0%. El análisis encontrado: C, 33.2; H, 2.6; N 16.2%. Calculado para  $C_{14}H_{15}ZnN_6Cl_2O_{0.5}$ : C, 40.8; H, 3.6; N, 20.4.



El procedimiento anterior fue repetido usando bromuro de zinc (II) (0.225 g, 1mmol) en una solución de 10ml de etanol, obteniendo un polvo blanco. Pureza: 68.0%. El análisis encontrado: 33.2; H 2.6; N 16.2%. Calculado para  $C_{14}H_{15}ZnN_6Br_2O_{0.5}$ : C 33.6; H 3.0; N 16.7%



Se pesó (0.119 g, 0.5 mmol) Cloruro de cobalto (II) hexahidratado fue disuelto en ml de etanol caliente y se adicionó a una solución de 10 ml de acetato de etilo caliente donde fue disuelto 0.133 g, (0.5 mmol) del ligante abz La solución azul obtenida fue puesta a reflujo por 4 h y mantenida en reposo por 2 semanas. EL polvo azul marino obtenido fue filtrado, lavado con etanol y secado al vacío. Pureza: 52%. El análisis

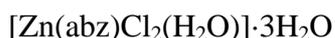
encontrado: C, 30.7; H, 5.0; N, 8.8%. Calculado para  $C_{12}H_{23}CoN_3O_6S_2Cl_2$ : C, 30.8, H, 4.9; N, 8.9%



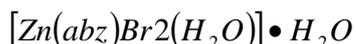
El procedimiento anterior fue repetido usando bromuro de cobalto (II) (0.102 g, 0.5 mmol) en 10ml de alcohol caliente, el resultando después de 2 semanas, fue un polvo verde esmeralda. Con una pureza de: 45.0%. El análisis encontrado: C 30.5; H 3.5; N 8.7%. Calculado para  $C_{12}H_{17}CoN_3O_3SBr_2$ : C 30.6; H 3.6; N 8.9%.



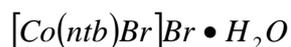
El procedimiento anterior fue repetido usando nitrato de cobalto (II) hexahidratado (0.1455 g, 0.5 mmol) en 10ml de alcohol etanol caliente. Después de dos semanas se obtuvo un polvo rosa pálido. El sólido fue separado por filtración y secado al vacío. Pureza: 42%. El análisis encontrado: C 39.1; H 4.2; N 15.1%. Calculado para  $C_{24}H_{35}CoN_8O_{10.5}S_2$ . C 39.6; H 4.8; N 15.4%



El procedimiento anterior fue repetido usando cloruro de zinc (II) (0.068 g, 0.5 mmol) en 10 ml de etanol caliente. Después de dos semanas se obtuvo un polvo blanco crema. Pureza: 67%. El análisis encontrado: C 30.1; H 3.7; N 8.6%. Calculado para:  $C_{12}H_{23}ZnN_3O_6S_2Cl_2$ : C 30.4; H 4.9; N 8.9%.



El procedimiento previo se repitió usando Bromuro de zinc (II) (0.1094g, 0.5 mmol) en 10 ml de etanol. Después de dos semanas se obtuvo un polvo blanco cremoso. Pureza 74%. El análisis encontrado C, 27.6; H, 3.3; N, 7.9%. Calculado para  $C_{12}H_{19}ZnN_3O_4SBr_2$ : C, 27.4; H, 3.6; N, 8.0%.



Se pesó Bromuro de cobalto (II), 0.218g, (1 mmol), y se disolvió en 10ml de alcohol y se adicionó a una solución donde la tris(2-benzimidazolil-metil)amina (0.204 g, 0.5 mmol) estaba disuelta en 10 ml de alcohol. Se precipitó inmediatamente un compuesto violeta. Pureza: 85%. El análisis encontrado: C, 44.6; H, 3.6; N, 14.8%. Calculado para  $C_{24}H_{23}CoN_7OBr_2$ : C, 44.7; H, 3.6; N, 15.2%.



El procedimiento anterior fue repetido usando nitrato de cobalto (II) hexahidratado 0.291 g, en una solución de 10 ml de alcohol obteniendo un polvo rosa. La pureza fue de: 80%. El análisis encontrado: C, 47.0; H 3.9; N, 20.7%. Calculado. para  $C_{24}H_{23}CoN_9O_7$ : C, 47.4; H, 3.8; N, 20.7%.



El procedimiento previo fue preparado usando cloruro de magnesio(II) hexahidratado 0.203 g, en una solución de 10 ml de alcohol, dando un polvo blanco. Pureza: 74%. El análisis encontrado: C, 51.3; H, 6.5; N, 16.4%. Calculado para  $C_{24}H_{28}MgN_7O_{3.5}$ : C, 50.9; H, 5.0; N, 17.3%.



El procedimiento previo fue repetido usando cloruro de calcio(II) (0.111,1 mmol) en una solución de 10ml de etanol, obteniendo un polvo blanco. Rendimiento: 72%. El análisis encontrado: C, 44.5; H, 4.7; N, 15.0%. Calculado para:  $C_{24}H_{35}CaN_7Cl_2O_7$ : C, 44.7; H, 5.5; N, 15.2%



Se disolvió 0.2187 g, (1mmol) de cloruro de cobalto en 10 ml de alcohol. Por separado 0.2037 g (0.5 mmol) de tris(2-benzimidazolil-metil)amina se disolvió en 10 ml de

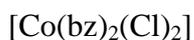
alcohol, posteriormente se adiciono la solución de la sal metálica a la del ligante. Un compuesto de color violeta oscuro precipitó inmediatamente, el cual fue filtrado al vacío y lavado con etanol. El rendimiento fue de 80% Análisis encontrado: C, 49.6; H, 4.41; N, 17.3%. Calculado para  $C_{24}H_{23}Cl_2N_7OCo$ : C, 50.2; H, 4.39; N, 17.2%.



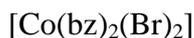
Se pesaron 0.1363 g, (1mmol) de cloruro de zinc y se disolvio en 10 ml de alcohol. Por separado se pesó 0.2037 g (0.5 mmol) de tris(2-benzimidazolil-metil)amina este se disolvió en 10 ml de alcohol posteriormente se adiciono la solución de la sal metálica a la del ligante Un compuesto de color blanco precipitó inmediatamente, el cual fue filtrado al vacío y lavado con etanol. Rendimiento 86% Análisis encontrado: C, 46.9; H, 3.36; N, 15.9%. Calculado para  $C_{48}H_{42}Cl_6N_{14}Zn_3$ : C, 47.1; H, 3.43; N, 16.0%.



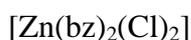
Se pesaron 0.2252 g, (1mmol) de bromuro de zinc el cual fue disuelto en 10 ml de alcohol. Por separado se peso 0.2037 g (0.5 mmol) de tris(2-benzimidazolil-metil)amina se disolvió en 10 ml de alcohol y luego se adiciona la solución de la sal metálica a la del ligante Un compuesto de color blanco precipitó inmediatamente, el cual fue filtrado al vacío y lavado con etanol. Rendimiento 81% Análisis encontrado: C, 38.9; H, 3.43; N, 12.3%. Calculado para  $C_{48}H_{42}Br_6N_{14}Zn_3$ : C, 38.7; H, 2.84; N, 13.1%.



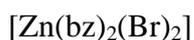
Se pesaron 0.1189 g (0.5 mmol) de cloruro de cobalto se disuelven en 10 ml de alcohol, a 35°C; por separado 0.118 g, (1 mmol) de bz se disuelven en 20 ml de alcohol y luego se adiciono a la solución de la sal metálica a la del ligante y se puso a reflujo durante 2 horas. Después de una semana y luego de evaporarse el disolvente, se obtiene en forma de cristales el compuesto Rendimiento: 75. %. Análisis encontrado: C, 45.8; H, 3.17; N, 15.5%. Calculado para  $C_{14}H_{12}N_4Cl_2Co$ : C, 45.9; H, 3.3; N, 15.3%.



Se pesaron 0.1094 g (0.5 mmol) de bromuro de cobalto se disolvió en 10 ml de alcohol, a 35°C; por separado se pesó 0.118 g, (1 mmol) de bz el cual se disolvió en 20 ml de alcohol y luego se adicionó la solución de la sal metálica a la del ligante y se puso a reflujo durante 2 horas. Después de cinco días y luego de evaporarse el disolvente, se obtuvo un precipitado el cual posteriormente fue filtrado al vacío y se lavó con alcohol obteniendo un polvo azul fino. Rendimiento: 72. %. Análisis. encontrado: C, 37.2; H, 2.64; N, 12.3%. Calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Br}_2\text{Co}$ : C, 37.1; H, 2.67; N, 12.3%.



Se pesó 0.0681 g (0.5 mmol) de cloruro de zinc y se disolvió en 10 ml de alcohol, a 35°C; por separado se pesó 0.118 g, (1 mmol) de bz se disolvió en 20 ml de alcohol y luego se adiciona la solución de la sal metálica a la del ligante y se lleva a reflujo durante 2 horas. Después de dos semanas y luego de evaporarse el disolvente, se obtiene un precipitado que luego de filtrarse al vacío y lavarse con etanol se obtiene un polvo. Rendimiento 65% Análisis. encontrado: C, 37.2; H, 2.64; N, 12.3%. Calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Cl}_2\text{Zn}$ : C, 37.1; H, 2.67; N, 12.3%.



Se pesaron 0.1126 g (0.5 mmol) de bromuro de zinc el cual fue disuelto en 10 ml de alcohol, a 35°C; por separado se pesó 0.118 g, (1 mmol) de bz y se disolvió en 20 ml de alcohol y luego se adiciona la solución de la sal metálica a la del ligante y se lleva a reflujo durante 2 horas. Después de dos semanas y luego de evaporarse el disolvente, se obtiene un precipitado que luego de filtrarse al vacío y lavarse con alcohol se obtiene un polvo blanco-grisáceo. Rendimiento 62% Análisis. encontrado: C, 45.3; H, 3.05; N, 14.9%. Calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Br}_2\text{Zn}$ : C, 45.2; H, 3.23; N, 15.1%.

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.-Acar JF, Goldstein F.W., 1996. Disk susceptibility test. En: Lorian V, de. Antibiotics in laboratory medicine, 4<sup>a</sup> de. Baltimore, Williams and Wilkins,; 1-51.
- 2.-Amsterdam, D.,1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V (ed): Antibiotics in laboratory medicine. 4<sup>a</sup> ed. pp 52-111.
- 3.- Appelbaum PC., 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. Clin, Infect.Dis.15:77-83.
- 4.-Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornberry C.,1991. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol; 29: 533-538.
- 5.- Barenfanger J, Drake C, Kacich G., 1999. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility *testing*. J Clin Microbiol 37: 1415-8.
- 6.-Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol; 45: 493-496.
- 7.- Berke J, Tierno P., 1996.Comparison of efficacy and cost-effectiveness of BIOMIC VIDEO and *VITEK* antimicrobial susceptibility *test* systems for use in the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol; 34: 1980-4.
- 8.-BioMerieux *VITEK*, Inc. GNI+ technical bulletin. bioMerieux *VITEK* Inc., Hazelwood, Mo 1996.
- 9.-. Bourbeau P, Heite B., 1998.Comparison of *VITEK* GNI and GNI+ Cards for identification of gram-negative bacteria. J Clin Microbiol; 36: 2775-7.
- 10.-Code of Federal Regulations(CFR)Ed. 21 Food and Drugs 1990. pag 285.
- 11.- Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B., 1994.Clinical impact of rapid *in vitro* susceptibility *testing* and bacterial identification. J Clin Microbiol; 32: 1757-62.
- 12.- Doern GV, Brueggemann AB, Perla R, Halkias D, Jones RN, Saubolle MA. 1997. Multicenter laboratory evaluation of the bioMerieux *VITEK* antimicrobial susceptibility *testing* system with 11 antimicrobial agents versus members of the family Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol; 35: 2115-9
- 13.-Dra. Elizabeth Palavecino Rosales,Profesor Auxiliar (Asociado). 1997. UDA Laboratorios Clínicos: Interpretación de los estudios de suceptibilidad antimicrobiana.; Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.;26:156-160

- 14.-Ericsson HM, Sherris JC., 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 217 (suppl. B):1-90.
- 15.-Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª ed, pag 79-87 Secretario de Salud Antonio González Fernández
- 16.- Fasola E.L., S. Bajaksouzian, P.C. Appelbaum, and M.R. Jacobs. ,1997. Variation in erythromycin and clindamycin susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* with four test methods. *Antimicrob Chemother*. 41:129-134.
- 17.- Fasola E.L., C.E. Fasching, and L.R. Peterson. 1995. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of Beta-lactam and Beta-lactamase inhibitor combinations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Lab. Clin. Med.* 125:200-211,.
- 18.-Grupo MENSURA., 2000. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap*; 13: 73-86.
- 19.-Isenberg, H.D., 1992. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, American Society for Microbiology,.
- 20.-Isenberg, H.D., 1988. Antimicrobial susceptibility testing: a critical evaluation. *J. Antimicrob, Chemother.* 22(Suppl. A):73-76,
- 21.-José A. García Rodríguez, 2000. *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades, Infecciosas y Microbiología Clínica*
- 22.-Jorgensen JH, Ferraro M.J., 1998. Antimicrobial susceptibility testing. general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*; 26: 973-980.
23. Kohner ,P.C, Patel R, Uhl JR, Garin K.M, Hopkins MK, Wegener L.T., 1997. et al. Comparison of agar dilution, broth microdilution, e-test. Disk diffusion, and automated VITEK methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp to Vancomycin. *J Clin Microbiol*; 35: 3258-63
- 24.- McCabe W.R., and T.L. Treadwell., 1985. In vitro susceptibility tests: correlations between sensitivity testing and clinical outcome in infected patients, p.925-937. In V. Lorain(ed) , *Antibiotics in Laboratory Medicine*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore..
- 25.-Miller L.A, Rittenhouse S.F, Utrup L.J, Poupard J.A., 1994. Comparison of three methods of determination of a single MIC of an antimicrobial agent. *J Clin Microbiol*; 32: 1373-1375.
- 26.- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Eds, Ellen Jo Tenover, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Tenover. Washington DC. American Society for Microbiology

- 27.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. MIC testing supplemental tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, PA.
- 28.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, PA.
- 29.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. 2000. NCCLS, Wayne, Pa.
- 30.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard M11-A4. 1997. NCCLS, Wayne, PA.
- 31.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. 2000. NCCLS, Wayne, Pa.
- 32.- Palavecino-Fasola E.L., S.Bajaksozian and M.R. Jacobs., 1996. *Streptococcus pyogenes* resistente a macrólidos, pero sensible a clindamicin: Un hallazgo común en diferentes países. Libro de Resumen Congreso Chileno de Infectología, 25.
- 33.-Peterson .R. and C.J. Shaholtzer., 1992. Test for bactericidal effects of antimicrobial agents: theoretical performance and clinical relevance, *Clin.Microbiol.Rev.*5:420-432.
- 34.-Rosenblatt J.E., 1991. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, p. 120-133. In V. Lorian (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 35.-Schiro D.D and Aldridge K.E., 1992. Broth microdilution susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. p. 5.6.1--5.6.15. In Isenberg HD (ed) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 36.- Shetty N, Hill G, Ridgway., 1998. The *VITEK* analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems and pitfalls. *J Clin Pathol*; 51: 316
- 37.- S.H. Ali Abdelwahed, Afaf H. El-masry, H. H. Fahmy., 2000, Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New benzimidazole derivatives.
- 38.-Steward CD, Stocker SA, Swenson JM, O'Hara CM, Edwards R., 1999. Gaynes RP, et al. Comparison of agar dilution, disk diffusion, microscan, and *VITEK* antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluorquinolone-resistant isolates of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*; 37: 544-7.
- 39.- Tavman A. Ülküseven B., 2003, Antimicrobial activity of Some 2- and 3- Pyridinyl-1 H- benzimidazoles and their  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$  and  $\text{Ag}^{\text{I}}$  Complexes.
- 40.- Vera Klimosová. Jan K. 2002., Synthesis and preliminary evaluation of benzimidazole derivatives as antimicrobial agents.

- 41.-Washington, J.A., 1991.Functions and activities of the aerea committee on microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin Microbiol Rev; 4: 150-155.
- 42.-Wexler, H.M and Finegold, S.M., 1991. Antibacterial susceptibility tests: anaerobic bacteria, p: 1133-1137. In A. Balows. WJ Hausler Jr., KL Herrmann, HD Isenberg and HJ Shadomy (ed) Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 43.-Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. A guide to sensitivity testing. J Antimicrob Chemother 1991; 27 (supl. D): 1-5