



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

Facultad de Estudios Superiores

Cuautitlán

**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA
INHIBITORIA DE COMPUESTOS DERIVADOS DE ÁCIDO
CARBÁMICO SOBRE CEPAS AISLADAS EN CASOS CLÍNICOS DE
Escherichia coli y *Staphylococcus aureus*“**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

P R E S E N T A:

YESICA NATALY GUERRERO VELAZQUEZ

ASESORES: Dr. Andrés Romero Rojas

Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano

Cuautitlán Izcalli, Edo. México

2012



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de compuestos derivados de ácido carbámico sobre cepas aisladas en casos clínicos de Escherichia coli y Staphylococcus aureus

Que presenta la pasante: Yesica Nataly Guerrero Velázquez
Con número de cuenta: 301204066 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de noviembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
1er SUPLENTE	QFB. Guadalupe Hernández Torres	
2do SUPLENTE	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a **DIOS, A MIS PADRES, Y A VICTOR HUGO**. A Dios por que ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidandome y dandome fortaleza para continuar. A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educacion, siendo mi apoyo en todo momento. A Victor Hugo por que siempre ha estado conmigo en este proyecto, asi como su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

- Gracias a mi mamá te agradezco primero el haberme permitido estar en tu vida, gracias por cuidarme y educarme. Tú siempre me has alentado a seguir adelante, a nunca conformarme y a que si se puede hacer 1000 cosas todos los días para salir adelante. Esta es una meta más que logro que también te pertenece. Gracias por todo el amor que me sigues dando. **TE AMO MAMI**
- Gracias a mi hermana **WENDY** por apoyarme aunque me lo demostró a su manera se te agradece.
- Gracias, **VICTOR HUGO SANCHEZ RODRIGUEZ** te has convertido en la persona más importante en mi vida desde hace 11 años, gracias por todos los momentos en que has estado conmigo apoyándome en las buenas y en las malas, gracias por tu amor, tu infinita paciencia y tu comprensión. Gracias por tu apoyo y ayuda incondicional. Te quiero a mi lado por siempre. **TE AMO NIKITO**
- Agradezco al Dr. **Andrés Romero Rojas** y al Dr. **Enrique Ángeles Anguiano** que me brindaron su apoyo entusiasta y la motivación constante, y de todos aquellos que participaron de alguna u otra manera en la realización de este Proyecto de Tesis, que no sería posible por su valiosa ayuda
- Gracias a los integrantes del jurado por su ayuda y consejos, ya que ellos nos permiten concluir este trabajo.
- Gracias a la **FESC-1** por ser mi segunda casa, y cobijarme en ella durante mi carrera, por recibirme todos los días temprano y despedirme muy tarde, por que entre sus aulas encontré muchos amigos, grandes profesores pero sobre todo un inmenso conocimiento.
- Finalmente a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haberme dejado permanecer en ella tantos años, por mi formación profesional, por la educación y calidad humana y por hacer la diferencia

Posdata:

A skrapí por acompañarme en mis desveladas todas (MI PERRITO)



INDICE GENERAL

NDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
1.- RESUMEN	1
2.-INTRODUCCIÓN	2
3.- GENERALIDADES	4
3.1 Antimicrobianos:	4
3.1.1 Clasificación de agentes antimicrobianos	4
3.1.2 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana	6
3.1.2.1 Método del antibiograma disco-placa:	7
3.1.2.2 Método de “Epsilon test”	8
3.1.2.3 Método de dilución	8
3.1.2.4 Dilución en agar	10
3.1.2.5. Dilución en caldo	16
3.1.2.6 Método Automatizados	12
3.2. Resistencia bacteriana:	13
3.2.1 Mecanismos genéticos de la resistencia bacteriana	13
3.2.1.1 Resistencia mediada por intercambio genético	13
3.2.1.2. Resistencia mediada a mutaciones cromosómicas	14
3.2.2 Mecanismos Bioquímicos de la resistencia bacteriana	14



3.2.2.1 Disminución de la permeabilidad	15
3.2.2.2 Inactivación enzimática del antimicrobiano	16
3.2.2.3 Modificación del sitio blanco donde actúa el antimicrobiano	16
3.2.2.4 Expulsión del antimicrobiano	16
3.2.2.5 Desarrollo de vías metabólicas alternativas	17
3.3 Carbamatos:	18
3.3.1 Farmacocinética y Farmacodinamia	19
3.3.2 Contraindicaciones y Advertencias	21
3.3.3 Interacciones	21
3.3.4 Reacciones adversas	21
3.4 <u><i>Escherichia coli</i></u>	22
3.4.1. Características morfológicas	23
3.4.2. Características bioquímicas	23
3.4.3. Patogenia de la infección	24
3.4.4. Diagnóstico	27
3.4.5. Epidemiología	28
3.4.6. Tratamiento	28
3.5 <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	30
3.5.1. Características morfológicas	31
3.5.2. Características bioquímicas	31
3.5.3. Patogenia de la infección	32
3.5.4. Diagnóstico	33
3.5.5. Epidemiología	34
3.5.6. Tratamiento	35
4.- JUSTIFICACIÓN	36



5.- HIPÓTESIS	36
6.- OBJETIVOS	37
6.1 Objetivos Generales	37
6.2 Objetivos Particulares	37
7.- MATERIALES Y METODOS	38
7.1 Materiales	38
7.2 Reactivos	39
7.3 Metodología	40
7.3.1 Cepas	40
7.3.2 Compuesto de derivados de Ácido Carbámico	40
7.3.3 Nefelómetro de Mc Farland	40
7.3.4 Preparación de las diluciones	42
7.3.4.1 Preparación de las placas de dilución	44
7.3.4.2 Inoculación de las cepas	44
7.3.4.3 Preparación de un control Blanco	44
7.3.4.4 Interpretaciones	44
7.3.4.5 Diagrama de flujo	45
8.- RESULTADOS	46
9.- DISCUSIÓN	56
10.- CONCLUSIONES	60
11.- ANEXOS	61
12.- BIBLIOGRAFÍA.	65



I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Prueba de difusión con discos para determinar la sensibilidad bacteriana. Obtenida de NCCLS	7
Figura 2.	Imagen de la técnica de expansión de difusión en disco	8
Figura 3.	Dilución en agar.	10
Figura 4.	Dilución en caldo. Preparación de las diluciones de los Antimicrobianos	11
Figura 5.	Descarboxilación de la monoamina del ácido carbónico	18
Figura 6.	Estructura general de los carbamatos	19
Figura 7.	Interacción del carbamato con el grupo hidroxilo de la serina en el sitio activo de la AchE	20
Figura 8.	<u><i>Escherichia coli</i></u> fotografía de microscopio electrónico de transmisión	22
Figura 9.	Bacilo de <u><i>Escherichia coli</i></u> por microscopio electrónico de barrido	23
Figura 10.	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	30
Figura 11.	Tinción de Gram de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	31
Figura 12.	Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (6641) con el compuesto LQM904 a diferentes concentraciones	48
Figura 13.	Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (6641) con el compuesto LQM905 a diferentes concentraciones	48
Figura 14.	Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (6641) con el compuesto LQM937 a diferentes concentraciones	48
Figura 15.	Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (7262) con el compuesto LQM904 a diferentes concentraciones	49
Figura 16.	Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (7262) con el compuesto LQM905 a	



diferentes concentraciones

- | | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 17. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (7262) con el compuesto LQM997 a diferentes concentraciones | 50 |
| Figura 18. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (7392) con el compuesto LQM904 a diferentes concentraciones | 50 |
| Figura 19. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (7392) con el compuesto LQM937 a diferentes concentraciones | 51 |
| Figura 20. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Escherichia coli</i></u> (7392) con el compuesto LQM997 a diferentes concentraciones | 51 |
| Figura 21. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (417) con el compuesto LQM997 a diferentes concentraciones | 52 |
| Figura 22. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (417) con el compuesto LQM914 a diferentes concentraciones | 53 |
| Figura 23. | Ejemplos de placas donde se observa la inhibición de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (419) con el compuesto LQM905 a una concentración de 256 µg/mL | 53 |
| Figura 24. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (419) con el compuesto LQM914 a diferentes concentraciones | 54 |
| Figura 25. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (419) con el compuesto LQM997 a diferentes concentraciones | 54 |
| Figura 26. | Ejemplos de placas donde se observa la inhibición de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (420) con el compuesto LQM905 a una concentración de 256 µg/mL | 55 |
| Figura 27. | Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (420) con el compuesto LQM914 a diferentes concentraciones | 55 |



Figura 28. Ejemplos de placas se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (420) con el compuesto LQM997 a diferentes concentraciones

55



II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación Taxonómica <u><i>Escherichia coli</i></u>	22
Tabla 2	Identificación bioquímica de <u><i>Escherichia coli</i></u>	24
Tabla 3	Factores de virulencia especializados que se asocian a <u><i>Escherichia coli</i></u>	25
Tabla 4	Clasificación Taxonómica <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	30
Tabla 5	Identificación bioquímica de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	31
Tabla 6	Factores de virulencia que se asocian a <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	33
Tabla 7	Clave de identificación de los carbamatos	41
Tabla 8	Preparación de diluciones	43
Tabla 9	Pruebas bioquímicas de identificación para <u><i>Escherichia coli</i></u>	46
Tabla 10	Pruebas bioquímicas de identificación para <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	46
Tabla 11	Resumen del comportamiento de la cepa <u><i>Escherichia coli</i></u> con el número 6641 a los diferentes compuestos	47
Tabla 12	Resumen del comportamiento de la cepa <u><i>Escherichia coli</i></u> con el número 7262 a los diferentes compuestos	49
Tabla 13	Resumen del comportamiento de la cepa <u><i>Escherichia coli</i></u> con el número 7392 a los diferentes compuestos	50
Tabla 14	Resumen del comportamiento de la cepa <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> con el número 417 a los diferentes compuestos	52
Tabla 15	Resumen del comportamiento de la cepa <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> con el número 419 a los diferentes compuestos	53
Tabla 16	Resumen del comportamiento de la cepa <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> con el número 420 a los diferentes compuestos	54



III LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA

SIGNIFICADO

AAF	Fimbrias de Adherencia Agregativa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosintrifosfato
CFA	Colonization Factor Antigens
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute /Instituto de Estándares Clínico y de Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	Bióxido de carbono
DMSO	Dimetil Sulfóxido
E. coli	<u><i>Escherichia coli</i></u>
ECEA	<u><i>Escherichia coli</i></u> enteroadherente (ó enteroagregativa)
ECEH	<u><i>Escherichia coli</i></u> enterohemorrágica
ECEI	<u><i>Escherichia coli</i></u> enteroinvasiva
ECEP	<u><i>Escherichia coli</i></u> enteropatógena
ECET	<u><i>Escherichia coli</i></u> enterotoxigénica
FTR	Factor de Transferencia de Resistencia
ITU	Infección Tracto Urinario
IMViC	Indol, Rojo de Metilo Vogues-Proskauer, Citrato
LIA	Agar Lisina Hierro
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
LT	Toxina Termolábil
M	Molar



MIO	Motilidad Indol Ornitina
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos
Omp-C	Proteína de Membrana Externa (Outer Membrane Proteína)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa "Polymerase Chain Reaction"
PSA	Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
R	Resistencia
S	Sensible
SARM	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u> Resistente a la Meticilina
SNC	Sistema Nervioso Central
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril
SST	Síndrome del Shock Tóxico
ST	Toxinas Termoestables
STX	Toxina Shiga
TSI	Agar Triple Azúcar Hierro



1.- R E S U M E N

Sin duda la aparición de los antibióticos ha sido muy importante para el tratamiento de muchas causas infecciosas, algunas de las cuales causan gran mortalidad y su uso permitió disminuir en forma importante y notable la morbí-mortalidad de algunos de estos males.

Sin embargo el primer problema que surgió con su uso fue la aparición de reacciones adversas, posteriormente se ha sumado la aparición cada vez más frecuente de bacterias resistentes y multiresistentes a uno o a varios antibióticos.

El presente trabajo tiene por objetivo mostrar los resultados obtenidos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de cinco compuestos llamados derivados del ácido carbámico en los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de dilución en agar.

Para la experimentación se utilizaron cepas clínicas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* las cuales se hicieron crecer en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) incubando 18-24 hrs., a 37° C.

De los cinco compuestos utilizados solamente con el LQM 905 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 256 µg/mL, siendo éste el que presenta la mayor actividad biológica frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* y en cambio para la cepa de *Escherichia coli* ninguno de los compuesto presentó inhibición.



2.- INTRODUCCION

La era moderna de la terapéutica antimicrobiana se inicia en 1934 con la descripción de Dogmark de la efectividad de la primera sulfonamida en el tratamiento de las infecciones experimentales de estreptococos.¹ La llamada “Era de oro “de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos.

Un resultado de la automedicación y del mal uso de algunos antimicrobianos, ha sido la aparición de microorganismos patógenos resistentes a ellos, y esto a su vez ha sido punto de partida de la necesidad cada vez mayor de contar con nuevos fármacos y/o alternativas.

La resistencia a los antimicrobianos se reconoció al poco tiempo de que estos fármacos comenzasen a emplearse clínicamente. El desarrollo de decenas de nuevos compuestos y sus posteriores modificaciones desde 1950 hasta la década de los años ochenta hizo pensar, falsamente, que el tratamiento de las principales enfermedades infecciosas bacterianas había quedado resuelto. Desde entonces, el incremento de cepas resistentes y de los problemas clínicos causados por éstas ha sido creciente.²

Los derivados del ácido carbámico en estudio que han sido probados frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras, hongos, así como también contra parásitos demostraron que tienen una buena actividad biológica. Se busca determinar el comportamiento de estos derivados, utilizando cepas bacterianas aisladas de muestras clínicas y encontrar la concentración mínima inhibitoria frente a ellas.

Por ello en los Laboratorios de Química Medicinal a Cargo del Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano y en conjunto con el Laboratorio de Biología Molecular a cargo del Dr. Andrés Romero Rojas, ambos de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, se han dado a la tarea de sintetizar y probar nuevos compuestos derivados del ácido carbámico,



que pretenden sea una de las alternativas de tratamiento antibacteriano con el menor grado de resistencia bacteriana y al menor costo.



3.- GENERALIDADES

3.1. ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos son sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas que son capaces de matar o inhibir el crecimiento de bacterias, hongos o virus, además es efectivo a bajas concentraciones.^{1,2}

3.3.1 Clasificación de agentes antimicrobianos:

Los antimicrobianos pueden clasificarse de acuerdo a muchos criterios, el más usado es el de su estructura molecular, sin embargo hay una serie de otros criterios usados los cuales se describen a continuación:²

Tipo de acción:

- **Bacteriostáticos:** son aquellos que inhiben el desarrollo y multiplicación del microorganismo; sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente microbiano.¹⁻⁹
- **Bactericidas:** poseen la propiedad de destruir al microorganismo, su acción es terapéuticamente irreversible.¹⁻⁹

Origen:

- **Naturales:** se obtiene a partir de microorganismos bacterias, hongo, etc.
- **Sintéticos:** se obtiene totalmente por síntesis química
- **Semisintéticos:** se obtiene por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.¹⁻⁹

Espectro de actividad:

- **Amplio:** actúan sobre un gran número de especies microbianas (ej. Tetraciclina)
- **Intermedio:** actúan sobre un número limitado de especies microbianas



- **Reducido:** actúan sobre un pequeño número de especies microbianas.¹⁻⁹

Mecanismo de acción:

- **Inhibición en la síntesis de la pared celular:** Inhiben la síntesis de peptidoglucano mediante la inhibición de la incorporación de la D-alanina al pentapeptico, y la inhibición que dan origen a la rigidez de la pared (ej. Penicilinas, cefalosporina y carbapenemes).¹⁻⁹
- **Alteración de la permeabilidad celular:** Altamente tóxicos interfieren en la integridad de metabolitos y nutrientes de las bacterias (polienos polimixinas e imidazoles).¹⁻⁹
- **Inhibición de la síntesis proteica:** La síntesis proteica se desarrolla en diferentes fases, en las cuales actúan diferentes antimicrobianos, como se explica a continuación: **Inhibidores de la fase de activación:** inhibe competitivamente la enzima isoleucil-ARNt sintetasa, con lo cual no puede incorporarse el aminoácido isoleucina al péptido en formación y la síntesis de proteínas se interrumpe. **Inhibidores del inicio de la síntesis proteica:** tienen su acción principalmente en la subunidad 30S, donde se unen a diferentes proteínas S y al ARN 16S. Bloquean la actividad normal del complejo de iniciación, impiden el inicio de la síntesis y provocan también una lectura errónea del ARNm. **Inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma:** se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma (proteínas S7, S14, S19), bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-ARN-t, e impidiendo la continuación de la síntesis proteica. **Inhibidores de la elongación:** inhiben la transpeptidación y la translocación actúan sobre la subunidad ribosómica 50S. Ej. Tetraciclinas, aminoglucósidos, anfenicoles y macrólidos.¹⁻⁹
- **Inhibición de la síntesis de ADN y ARN:** Actúan en la fase de duplicación y transcripción, que daña la multiplicación y metabolismo de la célula (ej. Quinolonas, ansamicinas, sulfonamidas y diaminopirimidinas).¹⁻⁹



La eficacia de los fármacos antimicrobianos depende del grado de sensibilidad de los microorganismos blanco, de esta manera los antimicrobianos de uso sistemático deben reunir las siguientes características:

- Ser más bactericidas que bacteriostáticos.
- Mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales.
- Que sean efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos.
- Los microorganismos susceptibles no se deben volver resistentes genéticamente o fenotípicamente.
- No debe ser tóxico y los efectos colaterales adversos tienen que ser mínimos para el hospedero .^{1,10}

3.1.2 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana:

Su principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo en una aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad “in vitro” de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.^{11, 12,16}

Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad. En el presente trabajo se recogen los métodos básicos más utilizados y aceptados para el estudio de la sensibilidad, así como los criterios para su interpretación y control. ^{11, 12,14}

Antes de llevar a cabo la actividad antimicrobiana es importante conocer al menos tres factores:

- Naturaleza del microorganismo causante de la infección.
- Grado de sensibilidad del microorganismo a diferentes antimicrobianos.
- Historia del medio ambiente.¹⁷

Para valorar la capacidad bactericida de los antimicrobianos se pueden emplear tres métodos:

1. Cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB)
2. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI)
3. La curva de letalidad y la actividad bactericida del suero.

Metodológicamente, en las pruebas de poder bactericida recomendamos la utilización de técnicas de microdilución tal y como recoge el “Manual of Clinical Microbiology” de la Sociedad Americana de Microbiología.⁴⁰

3.1.2.1 Método del antibiograma disco-placa:

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Kirby-Bauer y colaboradores, es uno de los métodos que el “National Committee for Clinical Laboratory Standards” recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los microbianos.¹⁸ El antibiograma disco-placa consiste en depositar en la superficie del agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo (el cual es ajustado a la escala de Mc. Farland al tubo equivalente a 0.5), discos

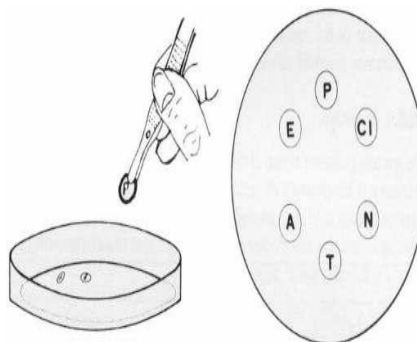


Figura 1. Prueba de difusión con discos para determinar a sensibilidad bacteriana. Obtenida de NCCLS

de papel filtro impregnado con los diferentes antimicrobianos.¹⁸ Tan pronto el disco impregnado con el antimicrobiano se pone en contacto con la superficie del agar, el antimicrobiano difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco;^{10, 17} la placa se incuba por 16-18 horas a 36 ± 1 . En un punto determinado, la concentración del antimicrobiano en el medio es incapaz de inhibir el microorganismo en estudio, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a las tablas publicadas por el NCCLS llamada ahora CLSI.^{11, 12} La interpretación requiere la correlación en el diámetro obtenido en el disco y la concentración del antimicrobiano en el disco. El diámetro de la zona de inhibición tiene una relación inversamente

lineal con la CMI, ya que, a mayor zona de inhibición mayor será la susceptibilidad del organismo y, en consecuencia, la concentración necesaria del antimicrobiano para inhibir su crecimiento será menor.

Sin embargo, los métodos disco placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.¹⁸

3.1.2.2 Método de Epsilon-Test:

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. El método E-Test (AB Biodisk, Suecia), permite mediante lectura directa, determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).^{2, 18}

Consiste de una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho contiene concentraciones crecientes de un determinado antimicrobiano que van desde 0.016 µg/mL hasta 256 µg/mL. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el microorganismo en estudio. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica, en la cual la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira y puede ser leída directamente lo cual se puede observar en la figura 2.²

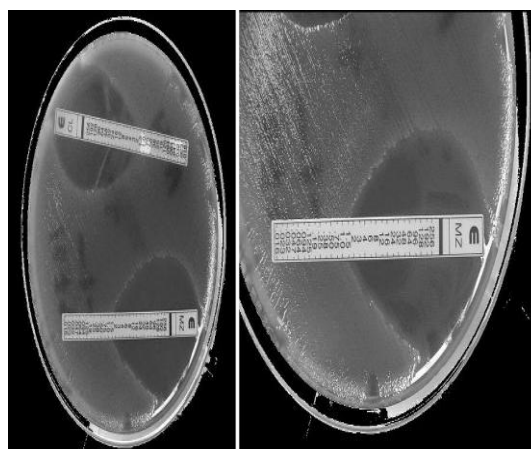


Figura 2. Imagen de la Técnica de expansión de difusión de disco. (http://www.danival.org/microclin/antibiot/_madre_antibiot.html)

3.1.2.3 Método 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 se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).^{4, 19}



La técnica de dilución en caldo y en agar son utilizadas para medir semicuantitativamente la actividad “*in vitro*” de un agente antimicrobiano frente a un cultivo de una cepa bacteriana y permite determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que es la mínima concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

La reproducibilidad de estas pruebas es del ± 1 dilución y para evitar una gran variabilidad estas deben ser estandarizadas y controladas muy cuidadosamente.

Los resultados obtenidos con el método de difusión en disco pueden estar afectados por varios factores que deben ser controlados para asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados:

- Utilizar Agar Mueller Hinton que está formulado y avalado de acuerdo a los criterios de CLSI. El medio debe tener una profundidad de 4mm
- Verificar el pH del agar de Mueller-Hinton, debe estar entre 7.2 y 7.4. Un pH bajo puede bajar la potencia de aminoglucósidos y macrólidos mientras que otros agentes antimicrobianos pueden parecer tener mayor actividad como las tetraciclinas. Si el pH es alto se observa el efecto contrario.
- Si en el momento de usar las placas hay humedad superficial excesiva deben colocarse en una estufa (35 °C) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos). La superficie de las placas deben estar húmedas, pero sin gotitas de humedad visibles en la superficie del medio ni en las tapas de la placa de Petri cuando se van a inocular.
- Preparar el inóculo del microorganismo con suspensión directa de la colonia, lo cual es recomendado para microorganismos exigentes (*Haemophilus* spp, *Neisserias*); se ajusta la suspensión del microorganismo a la turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland.

Las pruebas de sensibilidad mediante dilución son muy útiles en:

- El estudio de nuevo agentes antimicrobianos
- Confirmación de resistencia a aminoglucósidos determinada por pruebas de difusión en disco.^{4,19}

3.1.2.4 Dilución en agar:

Es considerado el método de referencia. Se realiza en placas que contiene determinada concentración a evaluar de un antimicrobiano, son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16-18 horas a 36 ± 1 °C.^{11, 12,14}

Después de la incubación, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las placas, con el cual se determina la Concentración Mínima Inhibitoria para el antimicrobiano.¹⁹

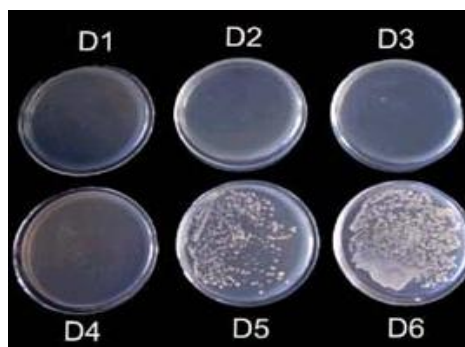


Figura 3. Dilucion en agar (http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani_am/html/sdx/huamani_am-TH.4.html)

3.1.2.5 Dilución en caldo:

En el método de dilución en caldo se utiliza una serie de tubos que contienen un medio de cultivo estéril y concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano necesario para inhibir el desarrollo de un microorganismo.^{18, 19}

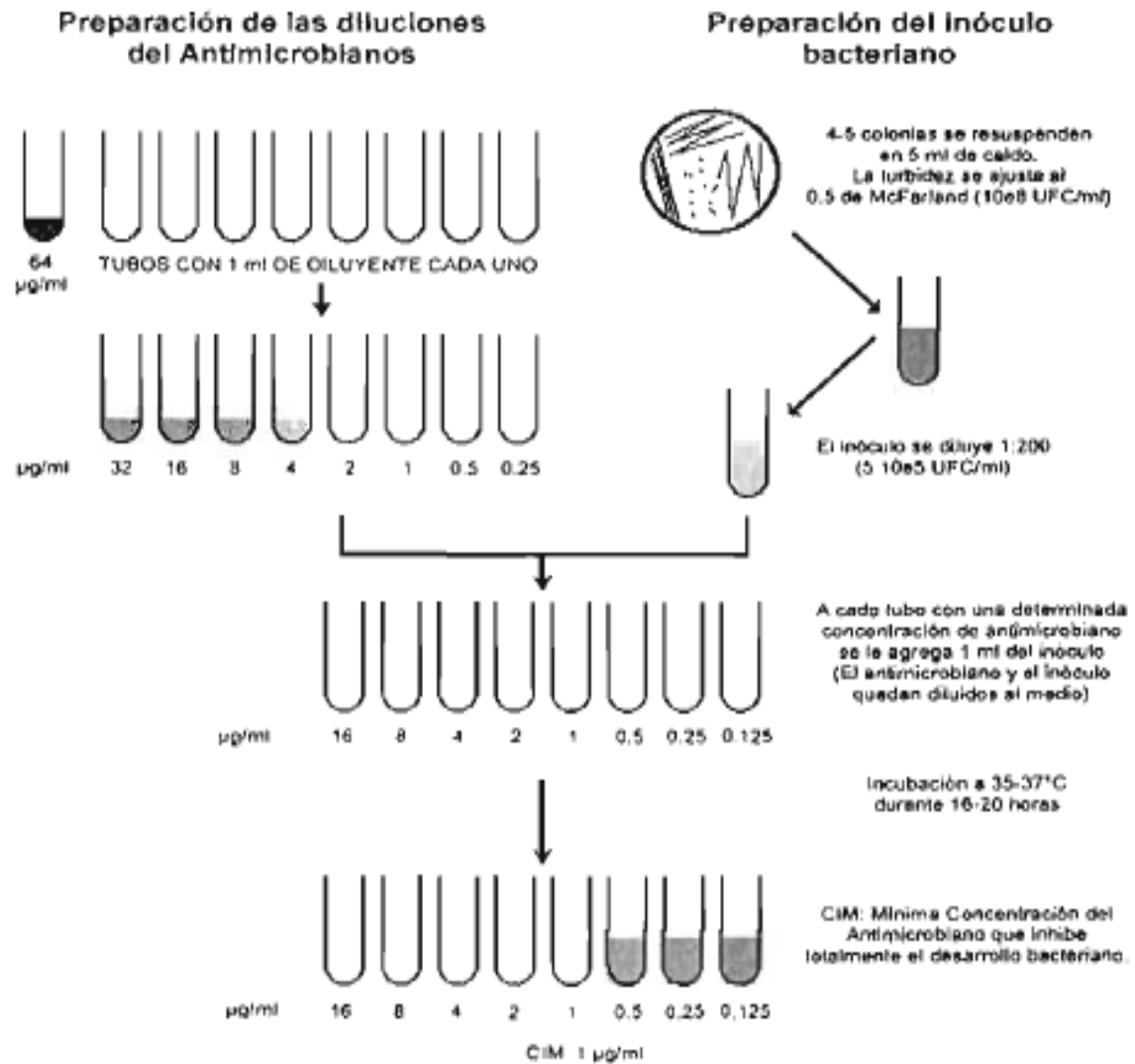


Figura 4 . Dilución en caldo “Preparación de las diluciones de los Antimicrobianos.
(http://www.danival.org/microclin/antibiot/img/atb_tubo_m.gif)



Todos los tubos se inoculan con el microorganismo que va a ser ensayado y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Como se observa en la figura 4. Se examinan los tubos para determinar en cuál de ellos se ha inhibido el crecimiento del microorganismo. También se puede calcular la CMI.²¹

3.1.2.6 Métodos automatizados:

En este momento existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos emplean el método de microdilución y períodos de incubación menores que los habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de enterobacterias y otros gérmenes de crecimiento rápido. Pero generalmente no son los adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales.^{11.12.14.15}



3.2. RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana: es el mecanismo a través del cual, la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos.²²

La resistencia bacteriana puede ser:

- **Natural:** cuando es la propiedad específica de algunas bacterias.
- **Adquirida:** cuando se produce una mutación cromosómica o la bacteria adquiere un plásmido de resistencia, es decir, un fragmento extracromosómico de DNA portador de genes que modifican la resistencia al antimicrobiano.²²

En la detección de la resistencia bacteriana se han identificado diferentes mecanismos utilizados por las bacterias que a continuación se mencionan:

3.2.1 Mecanismos genéticos de la resistencia bacteriana:

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética. Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos).¹³

3.2.1.1 Resistencia mediada por intercambio genético:

La información genética que controla la resistencia bacteriana hacia los agentes antimicrobianos se halla codificada en el DNA cromosomal y en DNA extracromosomal (plásmidos). La capacidad de resistencia se transmite por transferencia de genes mediante transformación, traducción y/o conjugación. La forma más eficaz y poderosa de propagación de la información genética se da por intermedio de los plásmidos (Factores R o plásmidos R). Los factores R son plásmidos conjugativos que le confieren a los microorganismos resistencia frente antimicrobiano. Los



determinantes FTR y r son replicones independientes que se unen para formar el factor R, pero los determinantes r solo confieren resistencia a la célula que los posee. El factor FTR codifica la formación de pelos específicos por los cuales se lleva a cabo el proceso de conjugación. También existen plásmidos que otorgan a los microorganismos la capacidad de resistencia frente a antimicrobianos y no poseen el Factor FTR, por lo que son conjugativos o “no autotransferible “. Este tipo de plásmidos son incapaces de iniciar la conjugación y no codifica el pelo sexual. Generalmente son transferidos por transducción o por plásmidos conjugativos corresidentes. La transferencia de genes que codifican la resistencia a fármacos también se puede realizar por transposones.^{23, 24}

3.2.1.2 Resistencia mediada a mutaciones cromosómicas:

Este tipo de resistencia se genera por mutaciones en los genes del microorganismo que controlan las estructuras o funciones sobre las que actúan los distintos antimicrobianos, modificando la susceptibilidad del microorganismo a los fármacos. Esta forma de resistencia por mutación puede aparecer en una generación (resistencia en un solo escalón) o en el transcurso de varias generaciones. En cambio, en el caso de la resistencia en varios escalones la sensibilidad al fármaco va disminuyendo progresivamente a medida que se forman nuevas generaciones, y llega un momento en el que el microorganismo se vuelve totalmente resistente al medicamento.^{23, 24}

3.2.2. Mecanismos bioquímicos de la resistencia bacteriana :

Para que un antimicrobiano pueda ejercer su acción ha de acceder a su sitio blanco, interactuar con las dianas, e inhibir eficazmente su función.

Las bacterias han desarrollado distintos mecanismo bioquímicos para resistir a la acción de los antimicrobianos de diversas formas.^{24,25}

- a) Disminución de la permeabilidad
- b) Inactivación enzimática del antibiótico
- c) Modificación del sitio blanco donde actúa el antimicrobiano
- d) Expulsión del antimicrobiano



e) Desarrollo de vías metabólicas alternativas.^{24,25}

3.2.2.1. Disminución de la permeabilidad

Se generan por cambios en receptores específicos y pérdida de la capacidad del transporte activo para un determinado antimicrobiano. También se puede producir cambios estructurales en la membrana celular que influyen en la permeabilidad en forma no específica. A causa del cambio en la permeabilidad celular los antimicrobianos no pueden penetrar en la célula, o lo hacen en muy pequeñas cantidades.^{23, 26}

Existen fundamentalmente dos mecanismos de resistencia:

1. Entrada disminuída:

1.1. *Permeabilidad de la membrana externa*: claramente definida en los microorganismos Gram negativas que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antimicrobiano.²⁶

1.2. *Permeabilidad de la membrana interna*: otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antimicrobiano hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.²⁶

1.3. *Porinas*: son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria. De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antimicrobiano.

Éste es el mecanismo empleado por Salmonella typhimurium (OmpC) contra cefalosporinas de primera generación, Serratia marcescens, E. coli y Pseudomonas aeruginosa contra aminoglucósidos y carbapenem.²⁶



2. El flujo activo: es debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas. Se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antimicrobiano sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antimicrobiano y se promueve la extracción activa del mismo. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol y β -lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario.²⁶

3.2.2.2. Inactivación enzimática del antimicrobiano :

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antimicrobiano haciendo que éste pierda su funcionalidad; las β -lactamasas son las más prevalentes. En las Gram positivas suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las Gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas.²⁷

3.2.2.3. Modificación del sitio blanco donde actúa el antimicrobiano:

Este tipo de resistencia se genera por mutaciones cromosómicas, o por la acción de plásmidos, que producen cambios en enzimas o sitios activos involucrados en reacciones metabólicas esenciales para la célula. Estos cambios provocan que el antimicrobiano pierda afinidad por el sitio blanco.^{23,26}

3.2.2.4. Expulsión del antimicrobiano:

Las bombas de expulsión se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antimicrobianos. Para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético.



El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula. Las bombas de salida pueden ser específicas para un fármaco (generalmente, codificadas en plásmido y, por lo tanto, transmisibles) o inespecíficas (generalmente expresadas en el cromosoma bacteriano). Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos empleándose un solo mecanismo.

Generalmente las bombas de salida causan pequeños aumentos en las CMI; sin embargo, cuando aparecen simultáneamente varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínicamente evidente. De esta manera, las bombas de salida, el cierre de porinas, las mutaciones en los sitios de acción y las enzimas hidrolíticas trabajan armónicamente para defender la bacteria de los antimicrobianos y por lo tanto, de su muerte.

La MexXY-OprM es otra bomba muy importante, ya que es responsable de la expulsión de múltiples antimicrobianos, en especial, los aminoglucósidos; recientemente se ha asociado con resistencia al cefepime; sin embargo, no tiene acción contra cefalosporinas de tercera generación, como el ceftazidime.^{23, 26,28}

3.2.2.5. Desarrollo de vías metabólicas alternativas

Este mecanismo de resistencia se produce en mutantes autótrofos que dependen del aporte de sustratos para la síntesis de productos que normalmente se obtienen a través de vías metabólicas en las que participan las enzimas que inhiben los antimicrobianos.

Por ello, el microorganismo es capaz de crecer a pesar de la inhibición enzimática ejercida por el antimicrobiano. Un ejemplo clásico es la resistencia a trimetoprim en bacterias dependientes de timina. Los microorganismos son capaces de sintetizar timidilato por el aporte externo de timina por una vía biosintética en la que actúa una timidina fosforilasa y un timidina quinasa que produce timidina, en vez de acudir a la vía habitual, que se encuentra bloqueada por la acción de trimetoprim.^{23,26,27}



3.3. CARBAMATOS

Durante la Segunda Guerra Mundial aparecieron los carbamatos junto con los organofosforados como desarrollo militar (gases neurotóxicos). A partir de la segunda mitad del siglo XX, se han utilizado como insecticidas, fungicidas y nematocidas; actualmente la mayoría de estos son usados como pesticidas y productos farmacéuticos en combinación con otros compuestos.

Los carbamatos, también llamados uretanos, son compuestos orgánicos que tienen una estrecha relación funcional con los carbonatos. La nomenclatura de los carbamatos o uretanos está relacionada con los ácidos carbónico y por lo tanto similarmente con los ésteres de ácido carbónico, la forma de nombrarlos es concordante.²⁹

Los carbamatos son compuestos orgánicos que poseen una estrecha relación funcional con los carbonatos. Normalmente se trata de la monoamina del ácido carbónico, que se descarboxila espontáneamente.³⁰ Como se muestra en la siguiente figura 5:

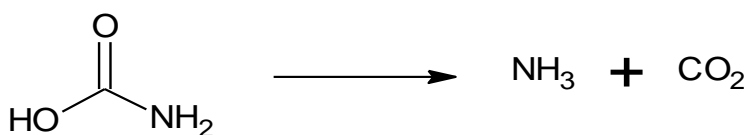


Figura 5. Descarboxilación de la monoamina del ácido carbónico (Santilan Ortega Odilon Abraham (1993). Síntesis de Carbamatos a partir de Aminas . FES-Cuautitlan –UNAM . Pag. 2-5)

los derivados del ácido carbámico, llamados también carbamatos son compuestos sólidos y estables a temperatura ambiente, cuya estructura general se muestra en la siguiente figura:

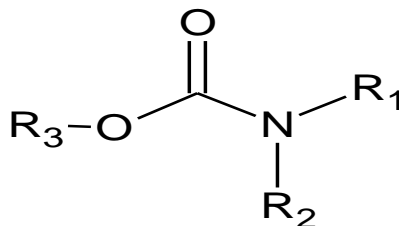


Figura 6. Estructura general de las carbamatos (Santilan Ortega Odilon Abraham (1993). Síntesis de Carbamatos a partir de Aminas . FES-Cuautitlan –UNAM . Pag. 2-5)

Donde R₁, R₂ y R₃ pueden ser un alquilo o un arilo.²⁹

3.3.1 Farmacocinética y farmacodinamia:

Absorción:

Al ser utilizados como insecticidas o fungicidas para plantas, ingresa a través de la piel, conjuntiva, vía respiratoria y vía digestiva, no atraviesa fácilmente barrera hematoencefálica, ello limita su toxicidad en el SNC.^{31,32}

Distribución:

En el ratón por su alta lipofilia se distribuye rápidamente en órganos ricos en lípidos (hígado, riñones, cerebro y músculo). No hay evidencia de su bioacumulación^{31, 32,33}

Mecanismo de acción:

Algunos carbamatos como los N-metil carbamatos son activos inhibidores de la acetilcolinesterasa tiene una alta afinidad por las esterasas, tales como la quimiotripsina, la acetilcolinesterasa, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasas plasmáticas y hepáticas, paroxonas y otras esterasas no específicas dentro del cuerpo, las cuales funcionan como sustrato normal de las enzimas acilasas de este grupo, así los carbamatos son capaces de inhibir principalmente la



Excreción:

Una vez biotransformados a compuestos hidrosolubles son excretados por orina, leche, heces y vías respiratorias.^{31,32}

3.3.2. Contraindicaciones y advertencias:

Se contraindican para pacientes que sufran de peritonitis u obstrucción del tracto gastrointestinal, se debe tener precaución con pacientes que tienen asma bronquial, bradicardia, hipertiroidismo y arritmias cardiacas.³⁷

3.3.3. Interacciones:

Se sabe que tiene interacciones con antibióticos del grupo de los amino glucósidos inhibiendo su acción y cuando se administra junto con otros anticolinesterásicos puede producir adicción.³⁷

3.3.4 Reacciones adversas:

Los compuestos anticolinesterásicos de muy baja liposolubilidad en intoxicación aguda, entre sus efectos presentan signos imputables al SNC. El amplio espectro de efectos sobre el SNC incluye confusión, ataxia, perdida de reflejos, convulsiones generalizadas, coma y parálisis respiratoria central.^{32, 37}

3.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli es la especie bacteriana que más comúnmente se recupera en los laboratorios clínicos y ha sido atribuída a enfermedades infecciosas causadas al humano. Se encuentra generalmente en los intestinos animales (incluido al humano y) por lo tanto en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli* en honor a su descubridor. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular.^{38,39} La tabla 1 muestra su clasificación taxonómica:



Figura 8. *Escherichia coli* fotografía de microscopio electrónico de Trasnmisión (<http://es.wikipedia.org/wiki/escherichia coli>)

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteria
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<u><i>Escheria coli</i></u>

Tabla 1. Clasificación Taxonómica *Escherichia coli*

3.4.1. Características morfológicas

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, una preparación tenida con Gram puede revelar células bacilares y cocobacilares Gram negativas, cuyo tamaño varía de 0.5 a 2 µm de ancho y de 2 a 4 µm de largo (figura 9). Es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forman esporas.^{40,}

41,42

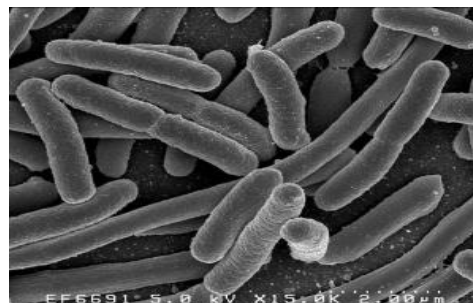


Figura 9. Bacilo de *Escherichia coli* por Microscopio electrónico de barrido (<http://es.wikipedia.org/wiki/escherichiacoli>)

3.4.2. Características bioquímicas:

Es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, en la prueba de IMVIC da como resultado: Indol y Rojo de metilo positivos y Vogues Proskauer y citrato negativos.

En la tabla 1 se muestra las principales características bioquímicas:

Prueba Bioquímica	% de Posibilidad	Prueba Bioquímica	% de Posibilidad
Oxidasa	0	Fermentación de salicina	40
Producción de indol	98	Fermentación de adonitol	5
Rojo de metilo	99	Fermentación de inositol	1
Voges-Proskauer	0	Fermentación de L-arabinosa	99
Citrato de Simmons	1	Fermentación de la rafinosa	50
H ₂ S (TSI)	1	Fermentación de L-ramnosa	80
Hidrólisis de urea	1	Fermentación de maltosa	95
Utilización de malonato	0	Fermentación de D-xilosa	95
Acido de glucosa	100	Fermentación de trealosa	98
Gas de glucosa	95	Fermentación de celobiosa	2
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentación de α -metil-D glucósido	0
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de eritritol	0



Arginina dihidrolasa	17	Hidrólisis de la esculina	35
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentación de melobiosa	75
Movilidad a 36 °C	95	Fermentación de D-arabitol	5
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0	Fermentación de D-manosa	98
crecimiento en KCN	3	Fermentación de glicerol	75
Fermentación de lactosa	95	Nitrato a nitrito	100
Fermentación de sacarosa	50	Tartrato de Jordán	95
Fermentación de D-manitol	98	Utilización de Acetato	90
Fermentación de D-sorbitol	94	Lipasa (aceite de maíz)	0
Fermentación de mucato	95	DNasa a 25 °C	0
Fermentación de dulcitol	60	ONPG	95

Tabla 2. Identificación bioquímica de Escherichia coli⁴¹

3.4.3. Patogenia de la infección:

Escherichia coli posee una gran variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que tienen los miembros de la familia de las enterobacterias, las cepas de E.coli responsables de enfermedades del tracto urinario y las gastroenteritis poseen factores de virulencia especializados⁴³, como se muestra en la siguiente tabla.

ADHESINAS	TOXINAS
Antígeno de colonización CFA/I, CFA/II Y CFA/III Fimbrias de adherencia agregativa AAF/I y AAF/II Proteínas formadoras de haces (Bfp) Intimina	Toxinas termoestables STa y STb Toxinas Shiga STX-1 STX-2 Hemolisina H1 y HA Toxinas termolábiles LT-I y LT-II



Pili P Proteína Ipa Fimbrias Dr	
INVASIVAS	MOTILIDAD Y QUIMIOTAXIS
Hemolisinas Invasión intracelular por Shigella –like	Flagelos
ATRIBUCIONES GENETICAS	PROPIEDAD DE SUPERFICIE ANTIFAGOCITOSIS
Transmisión de plásmidos Factor R y plásmidos de resistencia a fármacos Toxinas y otros plásmidos de virulencia	Capsulares Antígenos K LPS

Tabla 3. Factores de virulencia que se asocian a *Escherichia coli*:^{44,45}

Con base en el mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* se clasifican en seis grupos:

- ***Escherichia coli enteropatógena (ECEP)***: Fue el primer grupo identificado serológicamente y se asoció con casos de diarrea en niños que viven en países en vía de desarrollo, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. ECEP interactúa con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como adherencia /destrucción o lesión A/E (attaching and effacing). En la producción de la lesión A/E por ECEP, se observan cambios importantes en el citoesqueleto de la célula hospedera, los cuales incluyen la acumulación de actina polimerizada formando una estructura parecida a una copa o pedestal. La



adherencia inicial está relacionada a la producción de la fimbria BFP (Bundle Forming Pilus), el cual se requiere para la producción de diarrea por ECEP.

La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. El cuadro clínico se visible con diarrea aguada, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción.

- ***Escherichia coli enterotoxigénica (ECET)***: Colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis que tienen diversas formas denominadas CFA siendo su principal mecanismos de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil y toxina termoestable. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. El cuadro clínico se manifiesta con diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presente fiebre y vómito.

La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección.

- ***Escherichia coli enteroinvasiva (ECEI)***: Es descarboxilasa negativa, no móvil y lactosa negativa. El mecanismo de patogeneidad de ECEI es la invasión del epitelio del colon, para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula y posterior multiplicación de la ECEI dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes.

El cuadro clínico que produce ECEI se manifiesta con diarrea acuosa con sangre y moco, pero algunos casos solo presentan diarrea, está en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC.

- ***Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH)***: Produce verotoxinas que actúan en el colon. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E). Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome uremico-hemolítico (lo anterior mas infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), por



último, púrpura trombocitopenia trombótica (lo de más infección del sistema nervioso central).

- ***Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA):** Los estudios realizados sobre la capacidad de adherencia de la *E. coli* a células heteroepiteliales (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros dos mecanismos de: Uno llamado difuso, que produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación. El sitio blanco de ECEA es la mucosa del intestino delgado o grueso. El cuadro clínico que puede manifestarse en niños es diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa.
- ***Escherichia coli* de adherencia difusa (ECDA):** se sabe poco sobre su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.^{38,39,41}

3.4.4. Diagnóstico:

El diagnóstico se basa en el aislamiento e identificación del microorganismo. Se aplican métodos tradicionales, métodos “in vitro” e “in vivo” y de biología molecular.

El método tradicional es el aislamiento de la bacteria, tomada directamente de la muestra clínica. Después se siembra con la punta del hisopo en la parte superior de una placa de agar Mac Conkey u otro medio selectivo y con una asa bacteriológica, se continúa el aislamiento, sembrando por estría; después se incuba a 37°C durante 18-24 hrs. posteriormente se seleccionan de una colonia típica de *E. coli* lactosa positivas.



La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubo como TSI, LIA, MIO, citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, Voges Proskauer, malonato y caldo manitol-rojo de fenol.^{40,43}

La caracterización y clasificación de las cepas patógenas de *E. coli* se pueden hacer por métodos de biología molecular, una de las herramientas de diagnóstico más recientes, tal es en el caso del uso de sondas para la hibridación en fase sólida como en el “colony blot”.

Otros métodos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una hibridación en fase líquida, en donde la hibridación se realiza entre el ADN blanco presente en la muestra y el iniciador, que es una secuencia conocida de un fragmento específico de un gene involucrado en la patogenicidad de cepas de *E. coli*.^{40,43,45}

3.4.5. Epidemiología:

Un gran número de células de *Escherichia coli* están presentes en el aparato digestivo, y estas bacterias son una causa frecuente de septicemia, meningitis neonatal, infecciones de aparato urinario y gastroenteritis.

Escherichia coli es: 1) Bacilo gramnegativo que se aísla con gran frecuencia mayor en los pacientes con septicemia. 2) responsable de producir más del 80% de las ITU adquiridas en la comunidad, así como la mayoría de las infecciones nosocomiales. La mayoría de las infecciones son endógenas, es decir algunas células de *Escherichia coli* que forman parte de la flora bacteriana normal del paciente son capaces de producir una infección cuando las defensas del mismo se encuentran alterada.^{45, 46}

3.4.6. Tratamiento:

Depende del cuadro clínico. La amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas son medicamentos activos que se utilizan en este tipo de infecciones. En la cistitis no complicada o bacteriuria asintomática se puede utilizar: cotrimoxazol, sulfamidas y antisépticos como nitrofurantoina un mínimo de 5 días. Si la infección se acompaña de fiebre y afectación del estado general, con bacteriemia se administran antibióticos bactericidas



como: amoxicilina cada 6 horas o ampicilina cada 6 horas. Si existe resistencia, se utilizarán cefalosporina de 2^a o 3^a generación. Si existe alergia a beta-lactámicos se puede usar aminoglucósidos como gentamicina, tobramicina o netilmicina siempre que se demuestre la sensibilidad en el antibiograma. También se puede utilizar en este último caso las nuevas quinolonas como el ciprofloxacino, ofloxacino que alcanzan buenos niveles tisulares. En el caso de los abscesos, será necesario el drenaje y desbridamiento quirúrgico enérgico.⁴⁵

3.5. Staphylococcus aureus

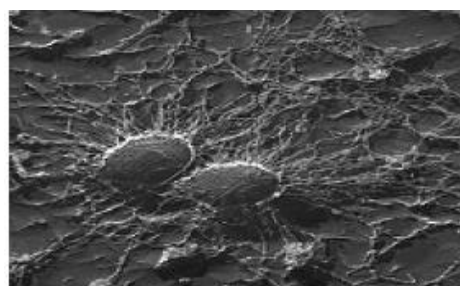
El Staphylococcus aureus es una bacteria, se encuentra comúnmente en la piel y en las fosas nasales de las personas sanas, causa gran variedad de infecciones, desde complicaciones menores de la piel y abscesos cutáneos; hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, Síndrome del Shock Tóxico (SST) y sepsis.^{38, 39} La tabla 4 muestra su clasificación taxonómica:

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
	Staphylococcaceae
Familia	Staphylococcus
Género	<u>Staphylococcus aureus</u>
Especie	

Tabla 4. Clasificación Taxonómica de Staphylococcus aureus

3.5.1. Características morfológicas:

Staphylococcus aureus es una especie bacteriana integrada por cocos de 0,5-1,5 mm de diámetro, que se presentan aislados en pares, tétradas o cadenas cortas y



típicamente son casi perfectos en su forma esférica (fig. 10).⁴⁵ Su característica morfológica más obvia es la notable

Figura 10. Staphylococcus aureus (http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)

tendencia a presentarse como masa de células aparentando racimos. Ello es consecuencia de una división celular en tres planos, junto a la tendencia de las células hijas de pertenecer en estrecha proximidad para crear el aspecto

característico. Estos grumos irregulares son tridimensionales, hecho manifiesto al examinar preparaciones frescas, pero en los frotis teñidos usualmente están aplanados creando el aspecto de láminas irregulares de células. Los estafilococos son bacterias no motiles, no forman esporas, no presentan pilis ni flagelos, no parecen tener capsulas en el caso de las variedades mucoides pueden sobrevivir tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.⁴⁷

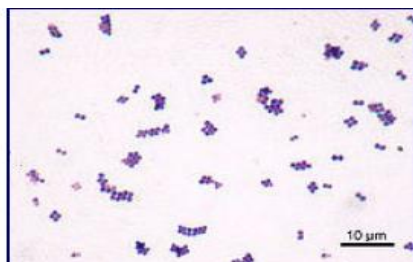


Figura11. Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus* (http://es.wikipedia.org/wiki/staphylococcus_aureus)

Estas bacterias se tiñen fácil e intensamente con los colorantes básicos de la tinción de Gram (cristal violeta) y son fuertemente Gram positivas (figura 11), aunque en ciertas ocasiones se pueden observar alguna Gram negativa.

3.5.2. Características bioquímicas:

Por lo común no requieren medios enriquecidos para crecer, aunque algunas cepas excepcionales necesitan la presencia de CO₂ o factores de enriquecimiento como hemina y menadiona para su desarrollo.

Pruebas bioquímica	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gram	Cocos agrupados en racimos Gram positivos
Motilidad	(-)
Pigmento	(+)
Catalasa	(+)
Coagulasa	(+)
Oxidasa	(-)
OF	fermenta glucosa
Urea	(-)
Ornitina descarboxilasa	(-)

Tabla 5. Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*³⁹



3.5.3. Patogenia de la infección:

Staphylococcus aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Las cepas de *Staphylococcus aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colágenasa. La función principal de estas proteínas puede ser la de ayudar a degradar los tejidos locales del hospedero para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina. Los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del hospedero.⁴⁶

En la tabla 6 se muestra una clasificación de los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria o si son toxinas y enzima:

FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	
Componentes de la Estructura	
Factor	Efecto Biológico
Cápsula	Es una adhesina, además impide la quimiotaxis y la Fagocitosis. Inhibe la proliferación de células mononucleares
Peptidoglicano	Proporciona estabilidad osmótica, y estimula la producción de pirógenos endógenos, y es una quimioatrayente leucocitario.
Acido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina
Proteína A	Altera función ciliar, estimula respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con la producción de radicales tóxico de oxígeno.
Toxinas	
Citotoxinas (α,δ,γ y leucocidina de PV)	Tiene un mecanismo poro-perforadora sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.



Toxinas exfoliativa(ETAY ETB)	Son proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el extracto granulosos de la epidermis.
Enterotoxinas (A-E,G-I)	Súper antígenos (estimula la proliferación de las células T y la liberación de citoxinas); estimula la liberación de mediadores químicos inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo.
Toxina del Síndrome de Shock Tóxico TSST-1	<i>Súper Antígeno (estimula la proliferación de las células T y la liberación citoxinas); produce extravasación o la destrucción celular de las células endoteliales.</i>
Enzimas	
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialuronicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los Staphylococcus en los tejidos
Fibrinolisisina	Disuelve los coágulos de fibrina
Lipasas	Hidroliza los lípidos
Nucleasas	Hidroliza el DNA
Penicilasa	Hidroliza las penicilinas

Tabla 6. Factores de virulencia que se asocian a *Staphylococcus aureus*⁴⁸

3.5.4. Diagnóstico:

Los datos clínicos y epidemiológicos son fundamentalmente en la orientación del diagnóstico oportuno. Para el diagnóstico etiológico de la infección por estafilococos se procederá al aislamiento en las muestras patológicas y la demostración de su patogenicidad.

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* pueden diagnosticarse fácilmente por medio de la tinción de Gram y por el examen microscópico del contenido del absceso o del tejido infectado. El aspecto de los estafilococos son grandes cocos Gram positivos que se encuentran aislados, en parejas o formando cúmulos. El cultivo sistemático del material infectado suele generar resultados positivos, y los



cultivos de sangre son a veces positivos incluso cuando la infección se localiza en zonas extravasculares.

Para el diagnóstico rápido de la infección por el microorganismo mencionado se han aplicado métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se utilizan con frecuencia creciente en los laboratorios de microbiología clínica. Hasta la fecha, los métodos serológicos no han sido útiles para el diagnóstico de las infecciones estafilocócicas.⁴⁹

- En el laboratorio esta bacteria crece tanto en agar sangre como en agar chocolate después de 24 horas a 37°C, y se observan colonias medianas, blancas, cremosas, brillantes, pasadas las 24 horas (48-72 horas), se pueden ver esas colonias blancas ahora de color amarillo.
- A las colonias más aisladas en la placa se le realiza una tinción de Gram, donde se observa al microscopio cocos grampositivos en racimo.⁴⁹
- Se realiza también la prueba de catalasa, que dará positivo, por la presencia de esta enzima en *Staphylococcus spp*, que desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (desprendimiento de burbujas) y esta prueba ayuda a diferenciar la de los *Streptococcus spp*.⁴⁹

Para la detección de *Staphylococcus aureus* se requiere realizar la prueba de la coagulasa que nos permite diferenciar al *Staphylococcus aureus* de otras especies del género *Staphylococcus*. La prueba de coagulasa en tubo se considera positiva si se detecta cualquier grado de formación de coágulo.⁴⁹ Los tubos que son negativos después de 4 horas se incuban a temperatura ambiente durante la noche y se leen después de 18 horas.

3.5.5. Epidemiología:

Dado que todas las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son principalmente endógenas, la colonización del hospedador desempeña un papel básico en la epidemiología



El sitio más frecuente de colonización de *Staphylococcus aureus* es la zona anterior de las vías nasales, aunque también puede colonizar la piel, la vagina, las axilas, el perineo y la bucofaríngeo. Se sabe que 25 a 50% de los sujetos sanos pueden estar colonizados de manera persistente o transitoria.

En general, *Staphylococcus aureus* es una causa importante de infecciones nosocomiales. Casi todas las personas que terminan por padecer infecciones por *Staphylococcus aureus* lo hacen a partir de sus propias cepas colonizadoras. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* también puede adquirirse de otras personas o por exposición ambiental. Por lo general, la transmisión se origina en uncolonización transitoria de las manos del personal sanitario, que así transfieren estas cepas de un paciente a otro. También se ha señalado la propagación de estafilococos en aerosoles procedentes de las secreciones respiratorias o nasales de individuos intensamente colonizados.³⁵

3.5.6. Tratamiento:

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* son actualmente resistentes a las penicilinas, por tanto debe emplearse penicilinas resistentes a estas enzimas.

El tratamiento de elección para este tipo de estafilococos es la cloxacilina y los derivados isoxazólicos. Para las cepas resistentes a estas nuevas penicilinas, denominadas meticilin-resistentes (SAMR), se emplea habitualmente vancomicina o teicoplanina.

Otros antibióticos que pueden usarse son las quinolonas: rifampicina, clindamicina, cotrimoxazol y tetraciclinas, siempre atendiendo al antibiograma. En las infecciones por *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a glucopéptidos se emplean antimicrobianos nuevos como: linezolid, quinupristina-dalfopristina y daptomicina.

Para el tratamiento de SNC no se emplean penicilinas isaxozólicas ya que suelen ser resistentes a ellas. Por lo tanto deben tratarse como un SAMR.³⁸



4.- JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana se define como “una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana, de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico” Esta resistencia bacteriana ha obligado al desarrollo y utilización de nuevos fármacos antimicrobianos. Cuando se lanza al mercado un nuevo fármaco antimicrobiano se define el espectro de microorganismo sobre los cuales son eficaces, pero este patrón va cambiando a medida que el fármaco se utiliza clínicamente, llegando hasta su desuso.

Con este trabajo se pretende demostrar que los derivados del ácido carbámico sean una alternativa en el tratamiento clínico y que ofrezcan otra opción terapéutica comparada con los antibióticos ya existentes en el mercado

5.- HIPÓTESIS

Si los derivados del ácido carbámico poseen una alta actividad antimicrobiana, es posible considerarlos para el desarrollo de nuevos productos terapéuticos.



6.- OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los derivados del ácido carbámico contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por medio de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, para conocer si estos compuestos pueden ser una alternativa terapéutica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de derivados de ácido carbámico sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos clínicos, utilizando el método de dilución en agar para establecer la actividad antimicrobiana de cada compuesto.
- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de derivados de ácido carbámico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos clínicos, utilizando el método de dilución en agar para establecer la actividad antimicrobiana de cada compuesto.



7.- MATERIALES Y METODOS:

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para llevar a cabo la experimentación en su mayoría fueron proporcionados por el laboratorio No. 18 de la unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

7.1 Materiales:

- 700 Cajas Petri de plástico 75 x 100 mm.
- 2 Asas bacteriológicas metálicas
- Cubreobjetos
- Matraces Erlenmeyer
- Vasos de precipitados de 250, 500 y 1000 mL.
- 80 Tubos de ensaye con tapones de rosca
- 25 pipetas graduadas estériles de 1 mL. marca KIMAX
- 10 pipetas graduadas estériles de 2 mL. marca KIMAX
- 10 pipetas graduadas estériles de 5 mL. marca KIMAX
- 20 pipetas graduadas estériles de 10 mL. marca KIMAX
- Mechero Bunsen
- Gradilla
- Papel aluminio
- Embudo

Equipo:

- Autoclave PRESTO
- Incubadora MAPSA
- Campana de flujo laminar
- Microscopio óptico (olimpus Mofelo CHS)



7.2 Reactivos:

- Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI)
- Agar Müeller-Hinton
- Agar Sales Manitol
- Agar Soya Trypticaseina
- Medio de Citrato de Simonns
- Medio de MR-VP
- Medio SIM
- Medio MIO
- Ácido sulfúrico 0.18 M
- Alfa-naftol
- Agua destilada estéril
- Alcohol-acetona
- Cloruro de bario 0.048 M.
- Cristal violeta
- Etanol 70%
- KOH 40%
- Lugol
- Peróxido de hidrogeno al 30%
- Rojo de metilo
- Safranina
- Solución Salina Fisiológica

Derivados del Ácido Carbámico:

Estos compuestos fueron proporcionados por el Laboratorios de Química Medicinal

- **L Q M 904**
- **L Q M 905**
- **L Q M 914**
- **L Q M 937**
- **L Q M 997**



7.3 Metodología:

7.3.1 Cepa:

- Las cepas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología del Hospitalito Gustavo Guerrero en cual se localiza en la Delegación Venustiano Carranza.
- Se utilizaron 35 muestras de Escherichia coli y 35 muestras Staphylococcus aureus, de las cuales se escogieron al azar 3 cepas de cada microorganismo para trabajar.
- Las muestras no deben tener más de dos pases de aislamiento para evitar la disminución de su virulencia.
- Para cada cepa se realizaron las pruebas de identificación primarias (tinción de Gram, Catalasa y Oxidasa) y las pruebas secundarias correspondientes para cada especie (Rojo de metilo (MR), Vogues-Proskauer (VP), Indol, Citrato y Coagulasa). Teniendo las cepas puras, se sembraron en placas con Agar BHI en forma masiva, se incuban por 18-24 hrs, a 37°C por duplicado.

7.3.2. Compuestos derivados del Ácido Carbámico:

Se usaron los derivados del ácido carbámico con las claves siguientes que se muestran en la siguiente tabla:

CLAVE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA
L Q M 904	 <chem>CCOC(=O)Nc1ccc(Br)cc1</chem>
L Q M 905	 <chem>CCOC(=O)Nc1ccccc1[N+](=O)[O-]</chem>

L Q M 914	
L Q M 937	
L Q M 997	

Tabla 7 Claves de identificación de los carbamatos

7.3.3 Nefelómetro de Mc Farland:

Debe prepararse en una serie de 10 tubos de rosca de 13x10, adicionando las siguientes soluciones: ^{44, 45}

<i>Tubo No</i>	<i>Cloruro de Bario al 1% mL</i>	<i>Ácido sulfúrico al 1% mL</i>	<i>Suspensión bacteriana por mL (1x10⁸)</i>
0.5	0.05	9.95	1
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15



6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Cerrar herméticamente los tubos, mezclar perfectamente bien, rotular cada uno de los tubos con su número y concentración bacteriana, de preferencia en la parte superior del tubo, de tal manera que no impida el paso de la luz a través de la solución preparada. El tiempo de vida media de esta serie de tubos es de un mes a temperatura ambiente, sin embargo sus densidades deben ser comprobadas para extender dicha vida media.

La utilidad que representa este nefelómetro es que se utiliza para colocar una concentración bacteriana aproximada en número de bacterias por mililitro (mL) para comparación óptica de la turbidez de cada tubo con una suspensión preparada a partir de un cultivo bacteriano puro.^{44,45}

7.3.4 Preparación de las diluciones.

Existen diversas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se eligió utilizar la prueba de dilución en agar debido al bajo costo del material y a la ventaja de poder probar varias cepas en una misma placa, además de que esta prueba nos ayuda a dar un resultado cuantitativo con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria casi del mismo modo que la del método de dilución en caldo.

Para cada compuesto se prepararon 50 mL. de una solución stock de una concentración de 10,240 µg/mL según la norma M-7 de la CLSI, con esta solución se procedió a realizar cada dilución problema, como se muestra en la siguiente tabla



Determinación de la concentración mínima inhibitoria de compuestos derivados del ácido carbámico sobre cepas clínicas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



CONCENTRACIÓN (MG/L) DEL ANTIMICROBIANO EN SOLUCIÓN STOCK	VOLUMEN SOLUCIÓN STOCK (ML)	VOLUMEN AGUA DESTILADA (ML)	CONCENTRACIÓN (MG/L) OBTENIDA DEL ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIÓN FINAL DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE LOS 19 ML DE AGAR
10240	1	0	10240	512
10240	1	1	5120	256
10240	1	3	2560	128
2560	1	1	1280	64
2560	1	3	640	32
2560	1	7	320	16
320	1	1	160	8
320	1	3	80	4
320	1	7	40	2
40	1	1	20	1
40	1	3	10	0.5
40	1	7	5	0.25
5	1	1	2.5	0.125
5	1	3	1.25	0.06
5	1	7	0.625	0.03
0.625	1	1	0.3125	0.015
0.625	1	3	0.1562	0.008
0.625	1	7	0.0781	0.004

Tabla 8. Preparación de Diluciones



7.3.4.1 Preparación de las placas de dilución:

A cada caja Petri se le añadió 1mL de las diluciones de cada compuesto mas 19mL de Agar Mueller-Hinton, las placas se homogenizaron con agitación continua. Se dejaron solidificar incubando por 18-24 horas a 37°C y se mantuvieron en refrigeración para su uso posterior. Todo se realizó en condiciones estériles.

7.3.4.2 Inoculación de las cepas:

Se preparó una suspensión de cada una de las cepas con solución salina fisiológica estéril ajustada a la turbidez visual comparable al estándar del tubo 0.5 de Nefelómetro McFarland. De esta suspensión se tomó 1µL con un asa calibrada y se sembró por estría.

7.3.4.3 Preparación de un control blanco:

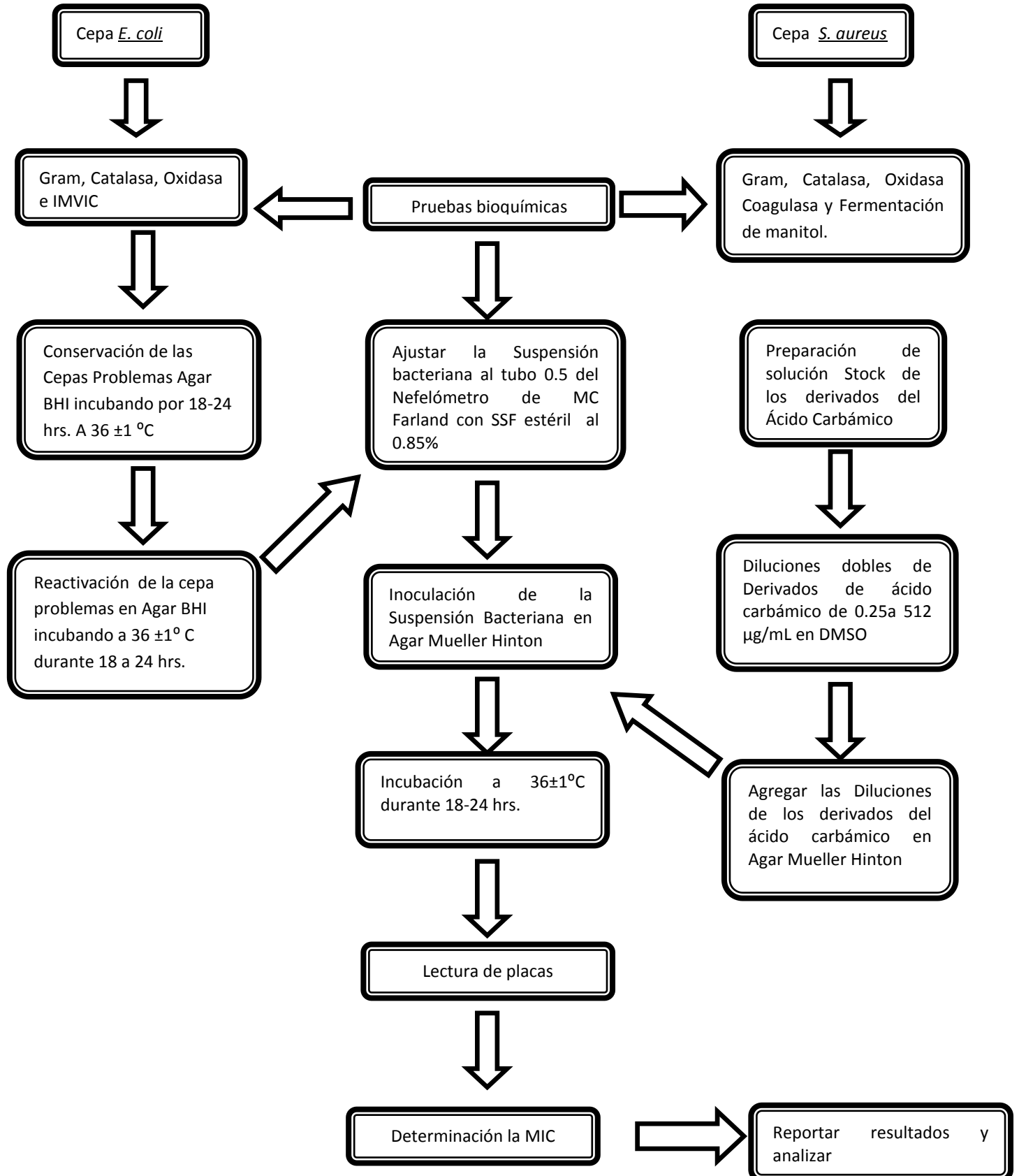
Se preparó una placa como control blanco, a esta placa se le agregaron 19mL de Agar Mueller-Hinton y se le adicionó 1mL de Dimetil sulfóxido. Esta placa sirvió para descartar inhibición del crecimiento bacteriano.

7.3.4.4 Interpretación:

La interpretación se realizó observando la presencia de crecimiento o no de las cepas en la superficie del medio, marcando con una R el crecimiento que denota resistencia y una S si no existe crecimiento denotando sensibilidad.



7.3.4.5 DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO





8.- RESULTADOS

A las seis cepas se les realizó la tinción de Gram, la prueba de Catalasa y Oxidasa para verificar género y para identificar especie se realizaron las pruebas bioquímicas secundarias que se muestran en las tablas que a continuación se presenta (tabla 9 y 10)

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	Bacteria <u><i>Escherichia coli</i></u>
Gram	Bacilos Gram negativos
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
Motilidad	(+)
Indol	(+)
RM	(+)
VP	(-)
Citrato	(-)
H ₂ S	(-)
Ornitina	(+)

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de identificación para *Escherichia coli*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	Bacteria <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>
Gram	Cocos agrupados en racimos Gram positivos
Motilidad	(-)
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
Coagulasa	(+)
Fermentación del manitol	(+)

Tabla 10. Pruebas bioquímicas de identificación para *Staphylococcus aureus*

Establecida la identidad de cada cepa se procedió a realizar las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (PSA).



Para los resultados de la PSA en dilución en agar se reporta la resistencia o susceptibilidad de cada cepa frente a las diferentes concentraciones utilizadas de los antimicrobianos, esto mediante la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Escherichia coli:

En las siguientes tablas se observa y expresa la sensibilidad o la resistencia presentada por las cepas *Escherichia coli* frente a las diferentes concentraciones de los antimicrobianos y será marcada con una S o una R respectivamente.

COMPUESTO	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
LQM 905	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 904	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 914	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 937	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 997	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 11. Resumen de comportamiento de la cepa *Escherichia coli* con el número 6641 a los diferentes compuestos.

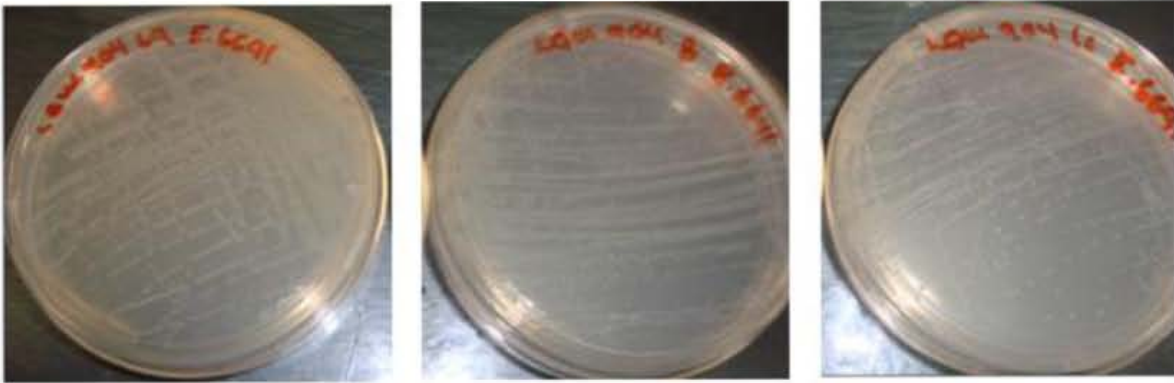


Figura 12. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (6641) con el compuesto LQM 904 a diferentes concentraciones



Figura 13. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (6641) con el compuesto LQM 905 a diferentes concentraciones



Figura 14. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (6641) con el compuesto LQM 937 a diferentes concentraciones

COMPUESTO	Concentración (µg/mL)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
LQM 905	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 904	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 914	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 937	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 997	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 12. Resumen de comportamiento de la cepa *Escherichia coli* con el número 7262 a los diferentes compuestos.

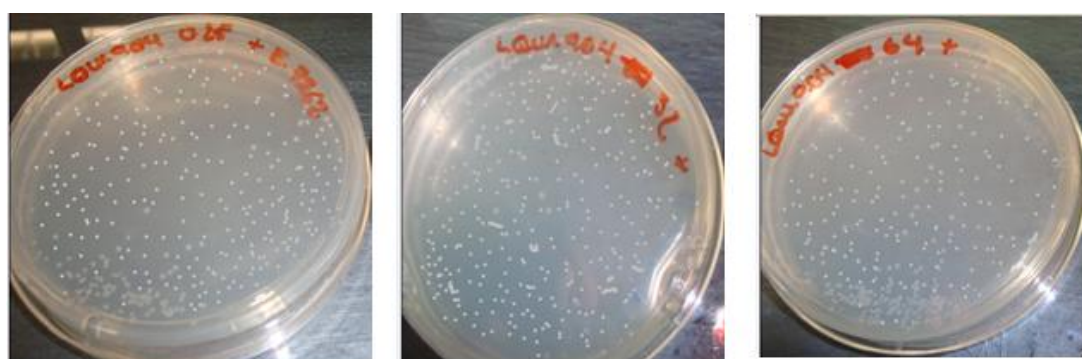


Figura 15. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (7262) con el compuesto LQM 904 a diferentes concentraciones



Figura 16. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (7262) con el compuesto LQM 905 a diferentes concentraciones



Figura 17. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (7262) con el compuesto LQM 997 a diferentes concentraciones

COMPUESTO	Concentración (µg/mL)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
LQM 905	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 904	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 914	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 937	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 997	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 13. Resumen de comportamiento de la cepa *Escherichia coli* con el número 7392 a los diferentes compuestos.

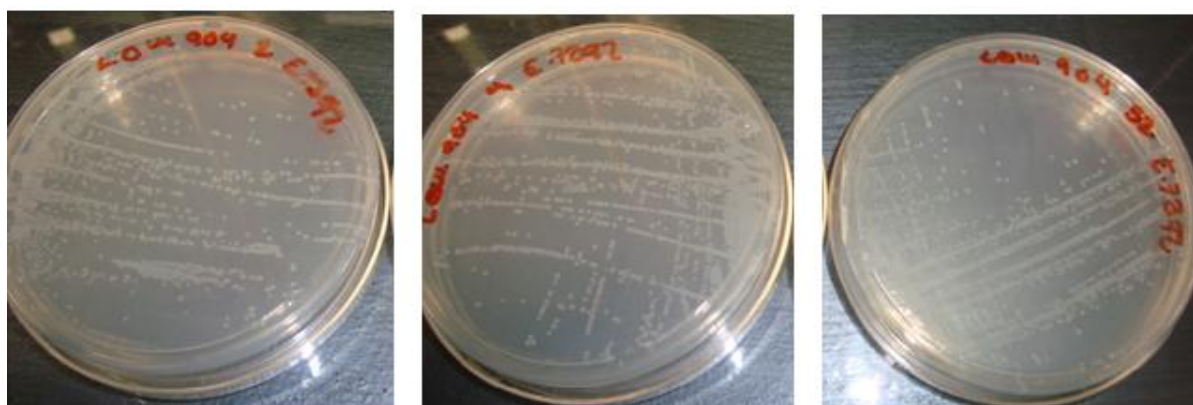


Figura 18. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (7392) con el compuesto LQM 904 a diferentes concentraciones



Figura 19. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (7392) con el compuesto LQM 937 a diferentes concentraciones



Figura 20. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Escherichia coli* (7392) con el compuesto LQM 997 a diferentes concentraciones

Staphylococcus aureus

En la siguiente tabla se observa y expresa la sensibilidad o la resistencia presentada *Staphylococcus aureus* frente a las diferentes concentraciones de los antimicrobianos y será marcada con una S o una R respectivamente.

COMPUESTO	Concentración (µg/mL)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
LQM 905	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
LQM 904	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 914	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 937	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 997	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

TABLA 14. Resumen de comportamiento de la cepa *Staphylococcus aureus* con el número 417 a los diferentes compuestos.

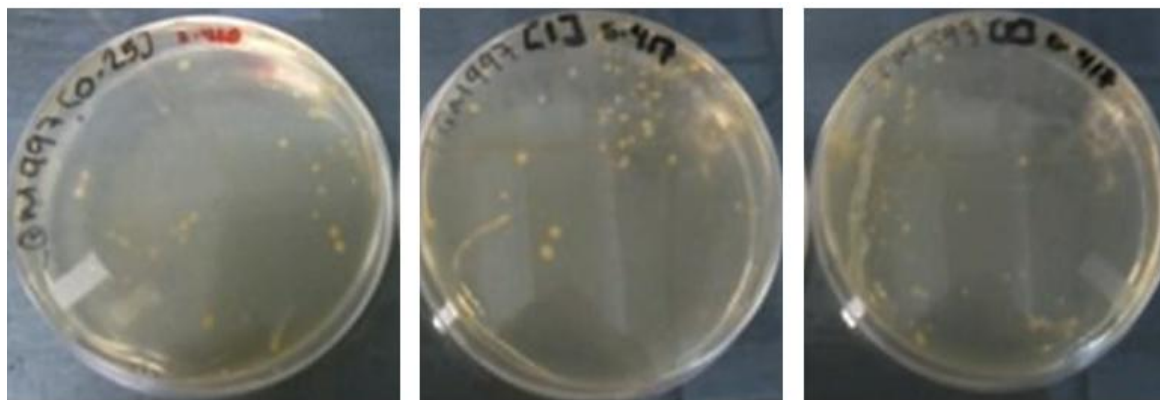


Figura 21. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (417) con el compuesto LQM 997 a diferentes concentraciones

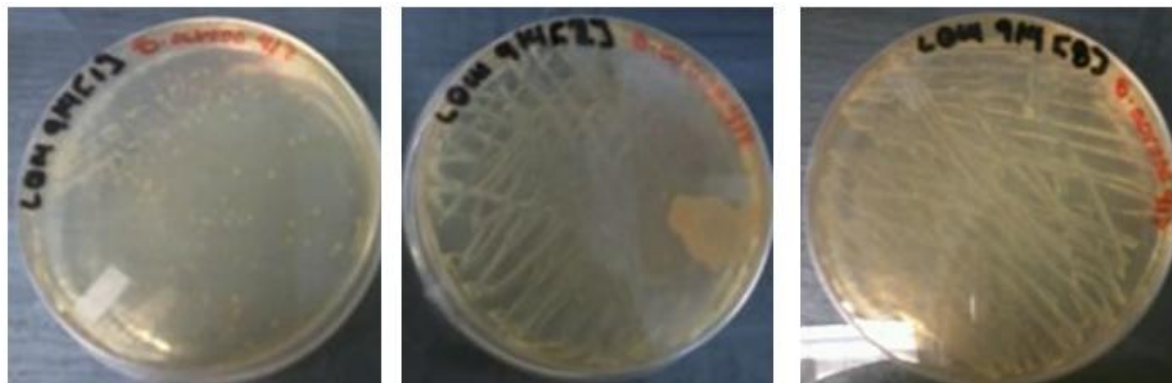


Figura 22. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (417) con el compuesto LQM 914 a diferentes concentraciones

COMPUESTO	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
LQM 905	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
LQM 904	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 914	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 937	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 997	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

TABLA 15. Resumen de comportamiento de la cepa *Staphylococcus aureus* con el número 419 a los diferentes compuestos.

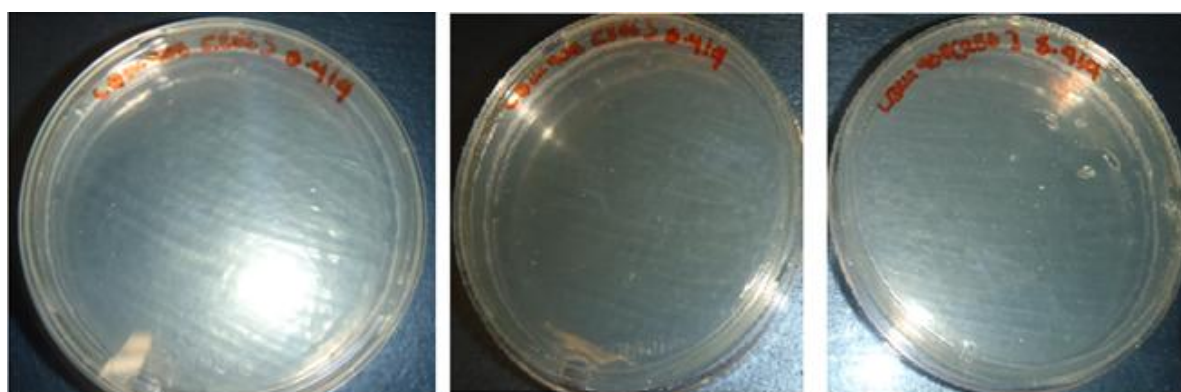


Figura 23. Ejemplos de placas donde se observa la inhibición de *Staphylococcus aureus* (419) con el compuesto LQM 905 a una concentración de 256 $\mu\text{g/mL}$

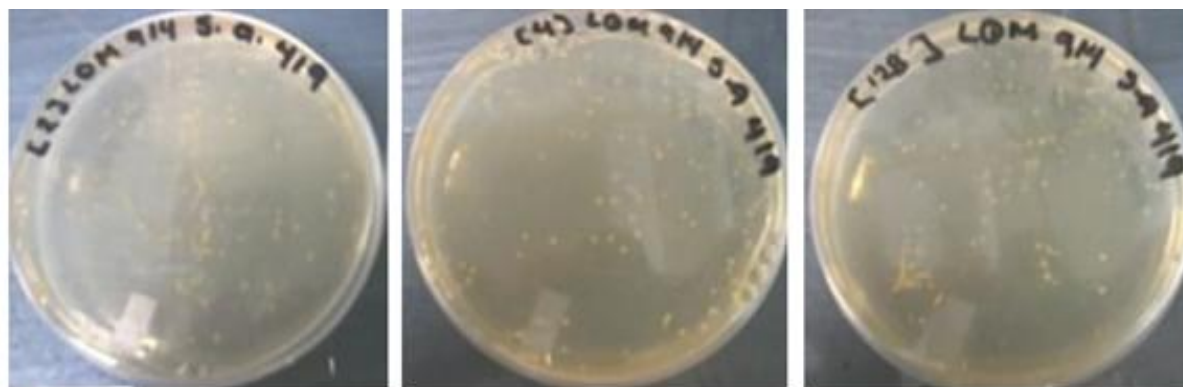


Figura 24. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (419) con el compuesto LQM 914 a diferentes concentraciones

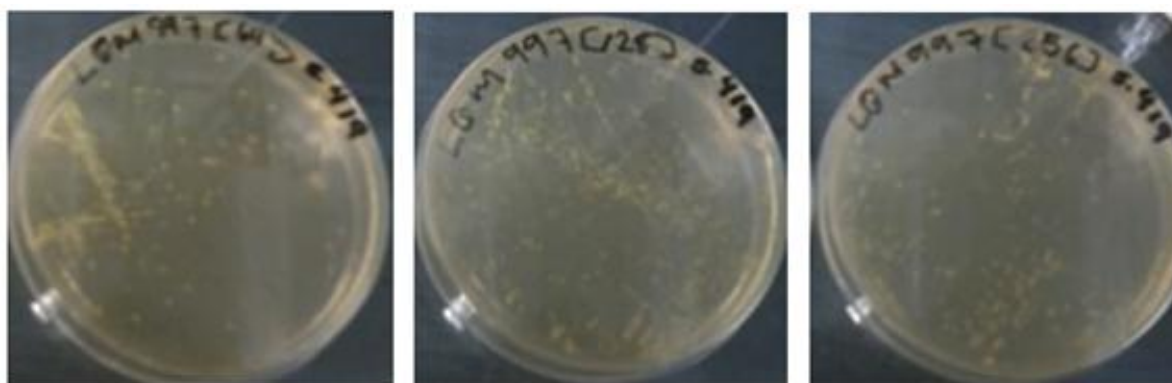


Figura 25. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (419) con el compuesto LQM 997 a diferentes concentraciones

COMPUESTO	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
LQM 905	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
LQM 904	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 914	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 937	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LQM 997	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

TABLA 16. Resumen de comportamiento de la cepa *Staphylococcus aureus* con el número 420 a los diferentes compuestos.

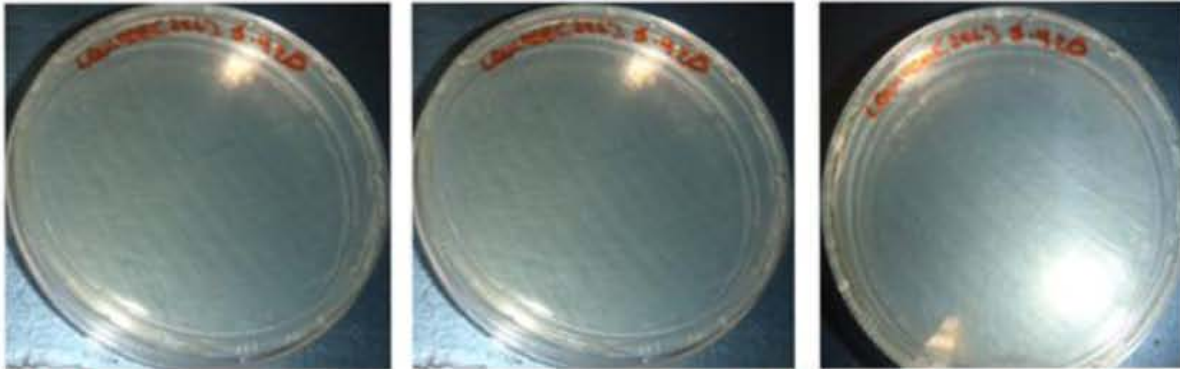


Figura 26. Ejemplos de placas donde se observa la inhibición de *Staphylococcus aureus* (420) con el compuesto LQM 905 a una concentración de 256 µg /mL



Figura 27. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (420) con el compuesto LQM 914 a diferentes concentraciones

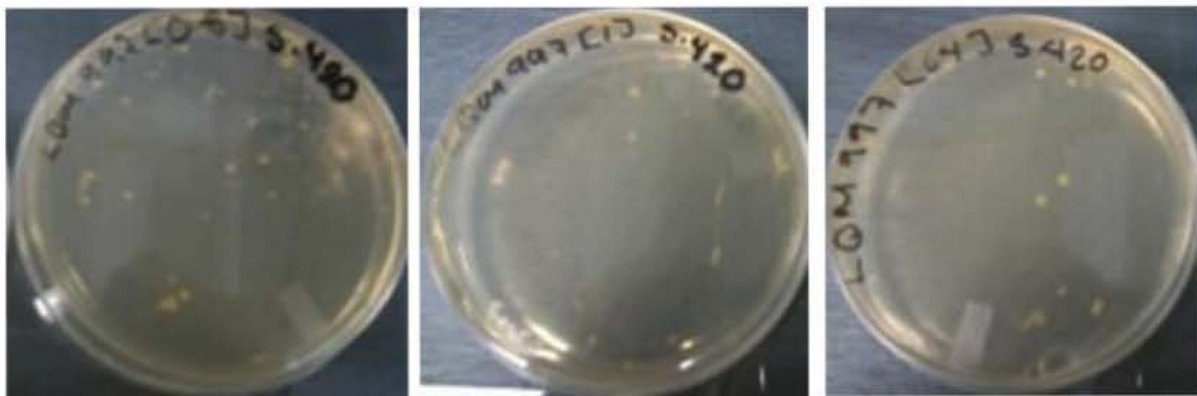


Figura 28. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (420) con el compuesto LQM 997 a diferentes concentraciones



9.- DISCUSION

La resistencia bacteriana tiene un impacto múltiple en la asistencia sanitaria: obliga al microbiólogo clínico a disponer de herramientas fiables para reconocer y analizar el problema, disminuye las opciones de tratamiento empírico y dirigido, obliga a emplear antimicrobianos de mayor espectro, contribuye al aumento de la morbimortalidad de causa infecciosa y de los costos de la atención sanitaria, y exige a corto o medio plazo el desarrollo de nuevos antimicrobianos que ayuden a controlar este grave problema.⁵⁰

El problemas de la resistencia es inevitable y esto obliga a pensar en utilizar nuevas estrategias en la terapia antiinfecciosa, basada en los conocimientos disponibles sobre la biología de los microorganismos patógenos .

Debido a la necesidad de encontrar nuevos fármacos que permitan un tratamiento más eficaz, eficiente y barato contra enfermedades provocadas por bacterias que son altamente resistentes a antimicrobianos que se encuentran en el mercado en la actualidad, por este motivo se pretende buscar nuevas alternativas como podrían ser los derivados del ácido carbámico.

Se ha reportado en trabajos anteriores que los derivados del ácido carbámico han demostrado ser compuestos de amplio espectro, contra *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba*; cestodos como *Hymenolepis nana*; y hongos.



Teniendo en consideración el panorama anterior, y comparando los resultados obtenidos para los carbámatos, de los cuales se esperaba que por ser un compuesto nuevo que no tiene estructura alguna que pudiera parecerse a los antimicrobianos actuales.

El presente trabajo se enfoca en las primeras evaluaciones de susceptibilidad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, ante 5 derivados del ácido carbámico, determinándose la Concentración Mínima Inhibitoria. Cada ensayo fue realizado por duplicado mostrando receptibilidad en el método.

En la Tabla 9 y Tabla 10 se reportan los resultados de las pruebas bioquímicas para cada microorganismo, esto nos sirvió para corroborar la identificación de cada una de las cepas con las que se trabajó.

Respecto a los resultados obtenidos para cada una de las cepas de *Escherichia coli* se pueden observar en las tablas 11,12 y 13 que ninguno de los compuesto no provocaron algún efecto considerable de inhibición sobre el crecimiento bacteriano frente a las diferentes concentraciones.

Es probable que dentro de las causas influyentes, de más importancia este la resistencia bacteriana; también se pueden considerar las variaciones estructurales (posición y/o tipo de sustituyentes en la molécula base) pueden producir variaciones en la actividad biológica.

En las figuras 12 a la 20 se puede observar que ninguno de los compuestos tuvo alguna actividad biológica contra de las cepas de *Escherichia coli*.



En la actualidad *Staphylococcus aureus* continua siendo uno de los patógenos más importantes y versátiles de la especie humana, ocupando un lugar preponderante en las infecciones de piel, tejidos blandos, neumonía y bacteriemias, cuyo tratamiento se hace cada vez más complejo debido a la gran capacidad del microorganismo de desarrollar resistencia a los antimicrobianos mediante una amplia gama de mecanismo que incluyen la producción de enzimas, la síntesis de blancos moleculares de baja afinidad por los antimicrobianos, las mutaciones o modificación enzimática de proteínas o ácido nucleico, la generación de formas persistentes de crecimiento lento con defectos en el transporte de electrones y las alteraciones en la síntesis o la estructura de la pared celular.⁴⁶

Este es el primer trabajo que se reporta, en el cual se utilizó los derivados del ácido carbámico en contra de *Staphylococcus aureus*.

Con respecto a los resultados obtenidos para cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus*, los cuales se reportan en las tablas 14,15 y 16, se puede observar que de los cinco compuestos derivados del ácido carbámico utilizados, solamente el LQM 905 reporto una actividad biológica con una Concentración Mínima Inhibitoria de 256 µg/mL.

En las figuras de la 21 a la 27 podemos observar que el carbámato LQM 905 inhibe totalmente el crecimiento de la Cepa de *Staphylococcus aureus* a una concentración anteriormente mencionada.

Aunque el compuesto de LQM 905 presento una actividad biológica el resultado no es muy alentador ya que la concentración es muy alta y como se sabe una de las



características principales de un antimicrobiano es que tiene que actuar a una baja concentración y en este caso es una concentración muy alta para evitar toxicidad.

Hasta el momento, los resultados obtenidos no fueron muy alentadores, y, aunque queda a un largo camino por recorrer, los carbámatos tienen buenas oportunidades de resultar una alternativa viable a los fármacos antimicrobianos existentes en el mercado.



10.- CONCLUSIONES

- Logramos obtener las Concentraciones Mínimas Inhibitorias que presentan los diferentes compuestos carbámicos utilizando el método de dilución en agar para establecer la actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*
- De los cinco compuestos utilizados ninguno presento actividad antimicrobiana contra las cepas de *Escherichia coli*; sin embargo el compuesto LQM 905 si presentó actividad antimicrobiana contra las cepas de *Staphylococcus aureus*
- Por lo tanto podemos establecer que el compuesto LQM 905 podría ser opción para uso terapéutico contra *Staphylococcus aureus* , aunque los resultados no fueron muy alentadores, se necesitaría realizarse mas estudios para ver si cumple con los requisitos necesarios para ser utilizado como un antimicrobiano.
- Se puede concluir con este trabajo que los derivados del ácido carbámico si presentan actividad antimicrobiana en algunas cepas bacterianas; se sugiere seguir con los estudios para observar la actividad antimicrobiana contra otras bacterias de importancia clínica



11.- ANEXOS

Composición y preparación de medios de cultivos

- Agar soya tripticaseina

Peptona de Soya	5.0g
Peptona de Caseína	15.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar Bacteriologo	15.0g

Suspender 40 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles

- Agar de Mueller Hinton

Agar-agar	17.0 g
Almidon	1.5g
Infusion de carne de res	300g
Peptona de caseina acida	15-3g

Rehidratar 38g de medio de cultivo en un litro de agua destilada, remojar de 10 a 15 min. Calentar hasta punto de ebullicion de 1 a 2 min. Para disolver por completo el medio. Esterilizar a (15 lb. de presion) durante 15 min. Enfriar de 40 a 45°C y vaciar en cajas Petri esteriles.

pH final 7.4±0,2

- Medio Indol y Ornitina (MIO) Bioxon



Extracto de levadura	3.0g
Peptona de Gelatina	10.1g
Peptona de Caseína	10.0g
L-ornitina	5.0g
Dextrosa	1.0g
Agar	2.0g
Purpura de Bromocresol	0.02g

Suspender 31 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta completa disolución y colocar en tubos de 13 x 100 con tapon rosca y esterilizar 15 minutos a 121°C.

pH final 7.5 ± 0.2

- Medio Sulfuro de Hidrogeno Indol Motilidad (SIM) Bioxon

Peptona de Caseína	20.0g
Peptona de Carne	6.1g
Sulfato de Hierro y Amonio	0.2g
Tiosulfato de sodio	0.2g
Agar	3.5g

Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver; calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir unos 4 mL en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.

pH final 7.3±0.2

- Medio Rojo de Metilo y Voges-P (MR-VP) Bioxon

Peptona de Caseína	3,5g
Peptona de Carne	3,5g
Dextrosa	5.0g
Fosfato dipotasio	5.0g

Suspender 17 g del polvo por litro de agua destilada. Calentar suavemente agitando hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.

pH final 6.9 ±0.2

- Medio de Citrato de Simmons



Citrato de sodio	2.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato dipotásico	1.0g
Fosfato monoamónico	1.0g
Sulfato de magnesio	0.2g
Azul de bromotimol	0.08g
Agar	15.0g

Suspender 24,2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

pH final 6.9 ±0.2

- Agar Sales Manitol

Extracto de Carne	1.0g
Pluripeptona	10.0g
Manitol	10.0g
Cloruro de Sodio	75.0g
Agar	15.0g
Rojo e fenol	0.025g

Suspender 111g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Esterilizar y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.

pH final 7.4 ±0.2

- Solución salina fisiológica

Disolver 0.8g de NaCl en 100ml de agua destilada, agitar frecuentemente para disolver por completo, verter en un matraz enmeyer y estandarizar la autoclave a 121°C (15lb de presión) 15 minutos.

- Tinción de Gram



- 1) Fijar bacteria en un portaobjetos
- 2) Agregar 1 gota de cristal violeta durante 1min. y enjuagar con agua
- 3) Agregar 2 gotas de lugol durante 2. min y enjuagar
- 4) Agregar 3 gotas de alcohol-acetona y enjuagar
- 5) Agregar 1 gota de safranina durante 1min. y enjuagar



12.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Dra. Cordiés Jackson Lilliam, et al. (1998). **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana**. Acta Medica 8(1):13-27
- 2.- Juana Guerrero. (2005). **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Nuevos Derivados del Ácido Carbámico contra Helicobacter pylori**. TESIS de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) – UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán . Mexico
- 3.-MICROBIOLOGIA OUTSIDE. Clasificación Antibióticos. (En línea). <http://www.microbiologiaoutside.com>.
- 4.- http://www.danival.org/microclin/antibiot/_madre_antibiot.html.
- 5.- Bergoglio, Remo M. (1993) **Antibióticos**. Editorial Medica Panamericana, 5ª ed. Madrid. Obra actualizada de consulta rápida y fácil; incluye esquemas terapéuticos.
- 6.- Flórez Beledo, Jesús. **Farmacología básica** (1997) Editorial Marban, 3ª ed., Madrid. Libro utilizado para los estudiantes de medicina
- 7.-Goodmann-Gilman. (1996) **Bases Farmacológicas de la terapéutica**. 2vol. 9ªed McGraw-hill -Interamericana de España, Madrid.
- 8.- Isselbacher, Kurt J. (director de la edición). Harrison (1994) **Principios de Medicina Interna**. 13ª ed., MacGraw-Hill- Interamericana de España. Madrid
- 9.- Lorenzo Velázquez, Velasco. (1993) **Farmacología y su proyección a la clínica**. Editorial Oteo, 16ª ed. Madrid. Interesante para revisar históricamente la evolución de los fármacos modernos.
- 10.-Sanford, Jay p. **Guía de Terapéutica Antimicrobiana**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1997. El minilibro de bolsillo para consultas rápidas sobre infecciones y antibióticos. Imprescindible para todo médico.



11.- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). **Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution.** Clinical Microbiology and Infection, 6 (9), p. 509-514

12.-**Métodos de dilución** (1999). (En línea) <http://www.seimc.org/protocolos/microbiología/cap11.htm>.

13.- Cercenado Mansilla Emilia. (2004). **Resistencia a los Antimicrobianos Servicio de Microbiología Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”** Madrid, España. P.145-152

14.- Andrews,Jennifer M. (2004) **Determinatio of Minimum Inhibitory Concentrations.**,Department o microbiology, City Hospital NHS trust, Birmingham B18 7QH.3. p. 18-47

15.- Garcia Rodriguez, Jose A. (2000) **Metodos Basicos para el estudio de la Snsibilidad los Antimicrobios.** SEIMC. Cap.11. p. 54

16.- Ordonez Smith de Daniels, Margot. **Nuevos métodos bacteriologicos para detector y evitar la resistencia bacteriana (En línea)** <http://www.encolombia.com/medicina/academ25262-nuevometodos2.htm>.

17.- DR. Mateos F.Pedro , **Agentes antimicrobianos y microorganismos.** Departamento de Microbiología y Genética , Facultad de Farmacia . Universidad de Salamanca.

18.- **Normatividad para puesta en Practica de Estudios de la Sensibilidad Antimicrobiana Mediante Discos.Sexta edicion,** Approved Standard NCCLS(Comité Nacional para Normas Laboratorio Clínico) A6. Vol. 13, N° 24. The National Committe for Clinical Laboratory Standard Press, Pennsylvania,USA.

19.- **Normatividad para puesta en Practica de Estudios de la Sensibilidad Antimicrobiana.** Octavo suplemento. Informativo NCCLS, M100-S8, Vol. 17, N° 2. Pennsylvania,USA.



20.-[http://www.Introduccion microbiologia clinica tratamientos articulos comentados/representación grafica del genoma.html](http://www.Introduccion_microbiologia_clinica_tratamientos_articulos_comentados/representación_grafica_del_genoma.html).

21.- Galgiani Jn. Stevens da. (1976) **Antimicrobial susceptibility testing of yeast a turbidimetric technique independent of inoculum size.** Antimicrob agents chemote:10:721-6

22.- Cordiés Jackson L, Machado Reyes La, Hamilton Cordiés MI. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.** Acta Med 1998; 8(1):13-27.

23.-Microbiologia Outside. **Resistencia Antibioticos. (En línea)**
<http://microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php./resistencia.php>.

24.-Cercenado E. **Resistencia a los antimicrobianos.** Servicio de Microbiología Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" Madrid.España

25.- Rivas C. (2006). **¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana....?** Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Revista Química Viva. Vol.2. Pag. 63-75

26.-Sussmann, P., Lorenzo Malttos y Andres Restrepo. (2004). **Resistencia bacteriana (En línea).**
<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>.

28.- José David Tafur, Julián Andrés Torres, María Virginia Villegas, et al. (2008) **Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas.** Centro Internacional de Investigaciones Médicas Volumen 12 No 3

29.- Núñez López Miriam Tesis año (2007). **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de compuestos derivados del ácido carbámico sobre cepas clínicas de *Escherichia coli*.** TESIS de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) – UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México

30.- Rivas Rosales Xochitl. (2005). **Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria contra *Helicobacter pylori* de nuevos derivados del ácido carbámico y en combinación con Nitazoxamida, Amoxicilina y Metronidazol.** TESIS de



Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) – UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México

31.- Arratia Quijada Jenny. (2004). **Estudio del Daño al ADN en Celulas de Estomago de Ratón Administrando con los derivados Carbamicos LQM 919 y LQM 996**. TESIS de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) - UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.

32.- Najera Martinez Maria del Rocio. (1995). **Efectos carcinogénicos de los insecticidas de uso permitido en Mexico. Revision bibliográfica**. TESIS, UNAM. FES. Cuautitlan, Mexico.

33.- González R., Jutziz E., Abascal M. (1989) **Estudios de efecto anticolinesterasico del ditiocarbamato 43G040 en ratones, ratas y perros**. Rev. Cub. Oncol; 5:239-49

34.- Carbamatos (2004). (En línea)
<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Carbamat.htm>.

35.- Bernal Anaya Sandra (2000). **Evaluación de Algunos Productos derivados de Ácido Carbámico como Agentes Microbianos. Pag. 57**. TESIS de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) - UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.

36.- Giorgio Papadaku, N.H. and A. Bertasso (1993). **Mechanisms of action of Cephalosporin 3-Quinolone Ester, Carbamates and Tertiary Amines in *Escherichia coli***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 37(3).p.559-570

37.- Klaassen Curtis D., (2001) Toxicology. **The basic science of poison**. 6 ed. Mc Graw-Hill.USA. p. 773-783

38.- JAWETZ, E., et al, (1997). **Manual de microbiología medica**. El manual moderno, México Pp.278

39.- MacFaddin, F.(1990) **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Editorial Médica Panamericana. México. Pp



- 40.- Koneman, Elmer W. et al (1999). **Diagnostico Microbiologico Texto y Atlas a Color**,5 ed. Mexicana Panamericana. Argentina
- 41.-RODRIGUEZ ANGELES, GUADALUPE. (2002). **Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de Escherchia coli**. Salud pública de Mexico.44 (5) p 465-475
- 42.- Todar, Kenneth. (2002). **Pathogenic E. coli**. University of Wisconsin Madison Departamento de Bacterioly (En línea) <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>
- 43.- SOUZA VELERIA, MARTHA ROCHA, et al.(2000). **Historia natural, ecología de la patogenicidad de Escherichia coli** . Boletín escolar. Instituto de Ecología. México p 25-40
- 44.- Escherichia coli. (en línea) http://www.prenhall.com/.../medie_portafolio/01html.
- 45.- MURRAY PATRICK R, et al. (2002) **Microbiología Medica.**, 4 ed. Elsevier. España p.201, 204, 215,264-265.
- 46.- BUSTOS-MARTÍNEZ J., HAMDAN-PARTIDA A., GUTIÉRREZ-CÁRDENAS (2006).**Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad**. Rev.Biomed; 17:287-305.
- 47.- URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/staphylococusaureus>
- 48.-QUISBERTH BARRERA SERGIO RODRIGO,(2007). **Aislamiento e identificación de Staphylococcus aureus en niños menores a 5 años en el hospital del niño Dr. Ovidio Aliaga Uria**.TESIS de Licenciatura (Bioquímica) Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas. Bolivia,La paz.



49. URL: <http://7staphylococcus aureus.blogspot.com/2007/11/diagnostico9162.html>.

50.- MARTINEZ MARTINEZ LUIS, CALVO JORGE. (2010). **Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública** *Enferm Infecc Microbiol Clin* ;28(Supl 4):4-9