



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA
DE DIVERSAS CEPAS BACTERIANAS DE IMPORTANCIA
CLINICA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTAN:

MARIA DOLORES HERRERA ZAMBRANO

MARIBEL RAMIREZ HERNANDEZ

T

QR46

H4

C.1



1080076926



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA
DE DIVERSAS CEPAS BACTERIANAS DE IMPORTANCIA
CLINICA.

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A N :

MARIA DOLORES HERRERA ZAMBRANO

MARIBEL RAMIREZ HERNANDEZ

T
92
H4



ASESOR: Q.F.B. LILIA E. FRAGOSO MORALES

" SEPAN CUANTOS....."

**LOS QUE LEEN GOZAN;
LOS QUE ESTUDIAN, APRENDEN.**

P. ANGEL MARIA GARIBAY K.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Que me ha permitido darme
la oportunidad de tener vida, y
hacer de ella lo que ahora soy.

A MIS PADRES:

Por su amor y comprensión
que siempre me han dado
incondicionalmente.

A MIS HERMANOS:

Por su cariño y apoyo que en
cada momento de mi vida,
he tenido.

A MI ASESOR:

por su enseñanza, comprensión y
motivación para seguir adelante

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

Por darme su amistad y el saber que
puedo contar con su apoyo y confianza

AGRADECEMOS A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS, AL FONDO
DE AYUDA A LA INVESTIGACION (FAI), YA QUE CON SU APOYO, SE
LOGRO LA REALIZACION DE ESTA TESIS.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes históricos	4
Generalidades	5
Objetivos	11
Material	12
Metodología	14
Procedimiento	15
Susceptibilidad por difusión en agar con discos	18
Susceptibilidad Kirby-Bauer en placa	19
Determinación mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	25
Resultados	29
Observaciones	44
Discusión	47
Conclusiones	48
Bibliografía	49

RESUMEN

El cepario microbiano de la facultad de Ciencias químicas se inició en Noviembre de 1992 con dos áreas definidas, el área bacteriológica y la micológica, en las cuales se preservan cepas bacterianas y micológicas de importancia médica.

Para preservar a un microorganismo deben probarse diversos medios de soporte, para encontrar él o los que conserven las características morfológicas, fisiológicas y genéticas que caracterizan a cada cepa.

Una vez que se han conservado las cepas bacterianas en los medios de soporte, hay que probar periódicamente: su viabilidad mediante recuperaciones en medios líquidos, su pureza sembrándolos en medios selectivos, la conservación de sus características fisiológicas mediante pruebas bioquímicas, y la preservación de su integridad genética mediante pruebas fisiológicas y de susceptibilidad a los antimicrobianos.

El cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.S.L.P. se encuentra en la etapa de evaluación de medios de soporte para la conservación de bacterias de importancia médica. Entre las pruebas para probar la presencia de alteraciones se encuentran:

Pruebas de actividad bioquímica.
Pruebas de sensibilidad a fármacos.
Pruebas morfológicas.

Los medios de soporte que se están evaluando son:

Resiembras
Conservación en aceite
Sílice
Feldespató
Sílica gel
Talco
Papel a temperatura ambiente
Criolita

Este trabajo tiene como objetivo determinar el patrón de sensibilidad - resistencia a los antibióticos, que presentan 12 cepas bacterianas Gram positivas y 12 cepas de bacterias Gram negativas de importancia médica, conservadas en el cepario bacteriano de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, con el fin de proporcionar los datos correspondientes a cada cepa empleada en docencia y sentar un precedente para la comparación de la preservación de sus características; datos que pueden poner en evidencia un cambio genético no apreciable en la evaluación de sus características bioquímicas.

La metodología seleccionada para estudiar los patrones correspondientes a cada bacteria incluyen el empleo del método de Kirby Bauer por difusión de los antibióticos en agar con sensidiscos, y la técnica estandarizada comercialmente en placa, en la cual se expone una bacteria a dos concentraciones de cada antibiótico (una alta concentración y una baja).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó con equipos comercializados UNICEP - MIC tipo 3, en el cual se emplea una placa plástica con una serie de pozos que contienen diversas concentraciones de 40 antibióticos, ante los cuales se expone la cepa en estudio obteniéndose los datos de la concentración mínima inhibitoria, por la ausencia de desarrollo bacteriano a una concentración dada. La concentración mínima bactericida (CMB) se obtiene por inoculación del contenido de cada uno de los pozos en cajas de Petri previamente preparadas, observándose cual dilución del antibiótico presentó un efecto bacteriostático y / o bactericida sobre cada cepa, según esta misma desarrolle o no después de ser expuesta a la serie de concentraciones de cada antibiótico.

Los patrones de sensibilidad y resistencia obtenidos fueron comparables con los esperados ya que en general se reconoce a los Estafilococos y a los Enterococos como resistentes a diversos antibióticos por ejemplo a la penicilina.

INTRODUCCION

A partir de que los microorganismos desarrollaron resistencia a los antibióticos nace la necesidad de hacer estudios de Sensibilidad - Resistencia a los antibióticos. Esta necesidad aumenta para obtener una mayor eficacia en el tratamiento de los pacientes, así como para saber a que concentraciones se inhibe el agente causal, y evitar que se administren a los pacientes dosis disminuidas ó elevadas que pueden alterar o dañar algún órgano o sistema.

Se han cometido muchos errores en el manejo de los estudios de laboratorio de microbiología, dando por resultado estudios incompletos, en los cuales después de determinar el agente causal solo se determina el patrón de sensibilidad a antibiótico, a petición médica, en vez de acompañar siempre el reporte del agente etiológico con su respectivo patrón de sensibilidad.

En la actualidad no solo es necesario realizar el estudio de el patrón de sensibilidad a antibióticos, también se requiere conocer la Concentración mínima inhibitoria (CMI) para el antibiótico ensayado, así como su Concentración mínima bactericida (CMB), relacionados a las concentraciones conocidas que alcanzan los diversos antibióticos en los diferentes fluidos del cuerpo (diversos sitios anatómicos).

ANTECEDENTES HISTORICOS

Durante los últimos 100 o 200 años la salud y la longevidad de las personas que viven en los países desarrollados han dado un gran paso adelante. Dos factores interrelacionados han contribuido a ello: la mejoría de la nutrición y el control de las enfermedades infecciosas, que incluyen las medidas preventivas de purificación del suministro del agua, control de los desechos humanos y de los vectores. La quimioterapia como ciencia principia en 1870 con Paul Ehrlich; en Alemania introdujo la idea de la acción directa y selectiva de un fármaco sobre los microbios infectantes. Lord Lister en 1880 observó que el desarrollo bacteriano era inhibido en algunos matraces de cultivos contaminados con hongos; en 1889 Doehle Pública una fotografía que ilustra la acción antibiótica de un organismo que denominó *Micrococcus anthracotoxicus* debido a su acción lítica sobre colonias de bacilos del ántrax que desarrollaban en la misma placa en cultivo mixto, Alexander Fleming: en 1928 descubre la penicilina, observó que un hongo contaminante no sólo estaba desarrollando en una placa de cultivo que había sido dejada abierta por descuido, sino que las colonias de estafilococos adyacentes al hongo estaban produciendo lisis por lo que dedujo que el hongo identificado era *Penicillium notatum*. La literatura médica hasta alrededor de 1930 está repleta de vívidas descripciones de las terribles infecciones causadas por los estreptococcus, los estafilococcus y los clostridios. El comienzo de la era del tratamiento antimicrobiano, con la introducción de las sulfamidas en la década de 1930, permitió finalmente que los médicos curaran muchas de estas infecciones letales. En 1935 Domagk. descubre las sulfonamidas, Chain y Florey: 1940 demuestran que la penicilina observada por Fleming podía convertirse en una substancia quimiotérapica efectiva. La importancia de la resistencia a los fármacos antimicrobianos está ilustrada por las catastróficas "epidemias" de resistencia al cloramfenicol que ocurrieron en México a fines de la década de 1960 y comienzos de la de 1970 con la disentería por *Shigella* y luego con las infecciones por salmonellas. En la epidemia inicial no se reconoció que el motivo por el cual los pacientes no respondían al cloramfenicol era que las bacterias se habían vuelto resistentes Mas bien se pensó que la enfermedad era causada por un protozoario. Se observó un cuadro similar 2 años más tarde en una epidemia tifoidea causada por microorganismos de la especie *Salmonella typhi* resistentes al cloramfenicol. Se estima que murieron más de 30,000 personas durante cada una de estas epidemias porque fueron tratadas sólo con ese fármaco. En 1960 Los laboratoristas utilizaron dispositivos serológicos para dispersar y diluir la muestra bacteriológica a fin de llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Esta miniaturización se conoció como método de microdilución en caldo, en 1975 se dieron a conocer equipos comerciales de microdilución en forma congelada en caldo y en placas secas que requieren la hidratación de los antimicrobianos con una solución de caldo-inoculó.(1, 6, 8, 10, 11).

GENERALIDADES

El principio fundamental de la quimioterapia es la toxicidad selectiva. Los agentes quimioterapéuticos son sustancias químicas que se usan para el tratamiento de enfermedades infecciosas o causadas por la proliferación de células malignas. El término antibiótico se aplica a aquellas sustancias químicas de origen microbiano que en pequeñas cantidades ejercen actividad antimicrobiana.(11, 17)

Propiedades de un antibiótico útil:

- 1).- Ser capaz de destruir o inhibir muchas especies de microorganismos patógenos. A este se le designa antibiótico de amplio espectro.
- 2).- Debe impedir la aparición rápida de formas resistentes del microorganismo.
- 3).- No debe producir efectos colaterales indeseables en el huésped, como reacciones de sensibilidad, alergia, daño al sistema nervioso o irritación de los riñones y conducto gastrointestinal.
- 4).- No debe eliminar la flora microbiana normal del huésped para no alterar el "equilibrio de la naturaleza", ni permitir que los microorganismos no patógenos normales, o las formas patógenas reprimidas por la flora habitual, declaren una nueva infección.(10, 11)

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS

1.- *ANTAGONISMO COMPETITIVO:*

Las sulfamidas impiden la utilización de ácido p-aminobenzoico inhibiendo la síntesis de ácido fólico. La inhibición se lleva a cabo en los organismos que sintetizan el ácido fólico a partir del ácido p-aminobenzoico ya que también son capaces de utilizar ácido fólico que tienen a su disposición en los tejidos del huésped. La inhibición es debida a la disponibilidad de productos de las vías biosintéticas que necesitan coenzimas de ácido fólico.

Las sulfamidas son bacteriostáticas. La eliminación de las sulfamidas, o incluso, la adición de ácido p-aminobenzoico al medio permitirán que se restablezca el crecimiento del organismo sensible.

La inhibición depende de un complejo de factores que interaccionan entre sí:

- La capacidad de la bacteria para sintetizar ácido fólico
- Su permeabilidad al ácido fólico
- La presencia en el medio de compuestos no competitivos que puedan revertir la reacción.(4, 10, 11, 16)

Ejemplos: Sulfonamidas: Sulfisoxazol, Trimetoprim sulfametoxazol, Sulfadiazina. Nitrofurantoína.

2.- INHIBICION POR ANTIBIÓTICOS:

Los antibióticos inhiben ó matan los microorganismos por diversas vías:

2.1 Inhibición de la formación de la pared celular:

Los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared celular son bactericidas ejercen su acción sobre las células en crecimiento, impidiendo la incorporación del péptido ácido N-acetilmurámico a su posición en la estructura mucopéptida que constituye la pared celular rígida, produciendo lisis celular, perdiendo su citoplasma , quedando las membranas citoplásmicas vacías.

Ejemplos: Penicilina, Cefalosporinas, Aztreonam, Meticilina, Ac. clavulánico, Sulbactam, Ampicilina, Amoxicilina, Cicarcilina, Vancomicina, Bacitracina.

2.2 Daño a la membrana celular:

Algunos antibióticos dañan la membrana celular destruyendo la barrera de permeabilidad de la célula, dejando escapar el contenido de la célula.

Ejemplos: Polimixina B, Colistina, Novobiocina.

2.3 Interferencia con la síntesis de proteínas:

Varios antibióticos aminoglucósidos, aminociclitolos (AGAC) interfieren con la síntesis de proteínas en la subunidad ribosomal 30s, impidiendo la fijación del t-RNA, la unidad ribosomal 50s actúa en la etapa de transpeptidación, modificando los factores que suministran energía, el proceso de translocación impide la regeneración inhibiendo la repetición del ciclo. Todos los antibióticos AGAC son bactericidas.

Ejemplos: Aminoglucósido: Gentamicina, Tobramicina, Netilmicina, Amikacina, Estreptomina, Espectinomina, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Eritromicina, Clindamicina, Lincominas.

2.4 Inhibición del metabolismo del ácido nucleico:

Formas en las que los antibióticos inhiben la función de los ácidos nucleicos:

- Interaccionan con el DNA molde y a veces con el RNA molde dificultando la transcripción o la replicación.
- Interacción con las polimerasas implicadas en la transcripción o en la replicación.
- Algunos antibióticos nucleosidos análogos de los ácidos nucleicos, dificultan la síntesis del ácido nucleico, o se incorporan a él provocando alteraciones en su estructura y función.(4, 5, 10, 11, 16)

Ejemplos: Rifampicina, Metronidazol; Quinolonas: Ac. Nalidíxico, Norfloxacin, Ciprofloxacina, Cinoxacina, Ofloxacina.

RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede ocurrir por mecanismos no genéticos o genéticos durante el tratamiento. Por lo general, la resistencia de tipo no genético suele atribuirse a la ausencia de los lugares de destino del fármaco dentro de la bacteria, es decir si no existen receptores de unión al fármaco o falta la vía metabólica necesaria para que este desarrolle su actividad, las bacterias mostrarán una resistencia intrínseca. La permeabilidad inadecuada también es responsable de la ineficacia de las tetraciclinas frente a ciertas bacterias Gram negativas.

La resistencia genética puede ser de origen cromosómico o transmitida por plásmidos extracromosómicos. La resistencia cromosómica a diversos antibióticos, se puede transferir a los gérmenes sensibles por el contacto intercelular o la conjugación. Las bacterias contienen ADN extracromosómico o plásmidos de resistencia (R), que actúan como si fueran virus sin envoltura externa. (10)

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

PRUEBA DE DIFUSIÓN: El método de difusión ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) y aceptado como estándar por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) es esencialmente una prueba cualitativa, que ubica a los microorganismos en la categoría de sensibles (susceptibles), intermedios (moderadamente susceptibles) o resistentes. Es una técnica simple, que generalmente se aplica a microorganismos llamados de desarrollo rápido.

Ventajas de la prueba de difusión:

- Eficaz para pruebas de rutina .
- Reproducible
- Económico

Desventajas:

- Interpretación no cuantitativa.
- No aplicable a muchos microorganismos de crecimiento lento.
- Inexactitud para predecir la susceptibilidad.

Los antimicrobianos se aplican a las placas de prueba en forma de discos secos de papel filtro.

Cuando se aplica el disco a la superficie inoculada se desarrollan varios eventos:

Los discos secos absorben agua del medio de agar; disolviendo así la fármaco. El antimicrobiano migra a través del medio de agar adyacente, obedeciendo a las leyes físicas que rigen la difusión de moléculas a través de un gel agar. El resultado final es un gradiente que cambia gradualmente de concentraciones de droga en el agar que rodea cada disco. Al progresar la difusión del antimicrobiano también se produce multiplicación microbiana. Después de una demora inicial se instala una fase de crecimiento logarítmico. En ese momento la multiplicación bacteriana es más rápida que la difusión de la droga y las células bacterianas no inhibidas por el antimicrobiano continúan multiplicándose hasta que puede visualizarse una capa de crecimiento. No aparece ningún crecimiento en el área donde la droga está presente en concentraciones inhibitorias; cuanto más susceptible el microorganismo probado, mayor la zona de inhibición.

El tamaño de la zona de inhibición también depende de la velocidad de difusión de la droga a través del agar.

Las zonas de inhibición observadas con un fármaco no pueden compararse con las obtenidas con otro antimicrobiano.

El diámetro de la zona de inhibición es indirectamente proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI), y puede ser interpretada como :

1.- Susceptibles (ó sensibles), significa que una infección causada por la cepa probada puede ser tratada con los antimicrobianos con las dosis recomendadas para ese tipo de infección y de especie infectante, excepto si hay contraindicaciones formales.

2.- Resistentes, contienen cepas no totalmente inhibidas por las dosis terapéutica habituales.

3.- Intermedias, comprenden una zona de sensibilidad-resistencia que impide discrepancias interpretativas mayores que podrán resultar de pequeños factores técnicos no controlado.

Las tres categorías antes mencionadas se fundamentan en:

La relación del halo de inhibición y la concentración del sensidisco a la concentración mínima inhibitoria (CMI), con la concentración del antimicrobiano en la sangre ó en algunos casos en la orina u otro líquido obtenido por la dosis administrada.

La relación de la susceptibilidad de la cepa probada con la de otros miembros de la misma especie.

SELECCIÓN DE POTENCIA DE DISCOS

Para las pruebas de susceptibilidad por difusión en agar se estandariza la cantidad de antimicrobiano del disco. La potencia estandarizada del disco se elige después de examinar los difusogramas y las líneas de regresión producidas probando discos de varias potencias. Los pequeños cambios de contenidos del disco producen cambios menores en los diámetros de zona: la duplicación de la potencia del disco aumenta generalmente los tamaños de las zonas en solo 2 ó 3 mm. El disco mas apropiado contiene solo suficiente antimicrobiano para producir zonas de 10 mm de diámetro. La concentración del antibiótico no debe de ser tan potente que las cepas susceptibles produzcan zonas demasiado grandes de inhibición (casi siempre <30 mm, rara vez >40 mm).

Los antimicrobianos pueden clasificarse en familias de estructuras químicas semejantes; también es posible clasificarlos en clases de fármacos con espectro de actividad similar.

Un solo representante de cada clase puede usarse para predecir la susceptibilidad o resistencia de un microorganismo a los fármacos de esa clase.

Las pruebas por dilución se usan para determinar la concentración mínima inhibitoria de un antimicrobiano necesaria para inhibir ó matar un microorganismo. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración sin crecimiento aparente; no se toman en cuenta los botones de desarrollo apenas visibles.

El subcultivo en un medio libre de antibiótico demuestra a menudo que ésta inhibición es un proceso reversible y que se pueden recuperar microorganismos viables (sobrevivientes) de la microdilución a nivel de la CMI y a varios niveles mayores de la microdilución ; esto puede esperarse con antibacterianos bacteriostáticos; en caso de antimicrobianos bactericidas habrá una concentración en la cual no pueda recuperarse sobrevivientes como consecuencia del efecto letal. Este efecto puede ser medido y se define convencionalmente como la menor concentración de un antimicrobiano que reduce la población de un microorganismo a 0.1% ó menos de número de células presentes en el inóculo original y se designa como concentración mínima bactericida (CMB).

Las CMI y CMB son solicitados para establecer regímenes terapéuticos óptimos para ciertas infecciones, dado que el éxito de la terapia antimicrobiana depende mucho de los propios mecanismos de defensa del huésped, que en última instancia destruyen y eliminan los microorganismos que han sido reducidos por los agentes antimicrobianos bactericidas ó bacteriostáticos. Para los antibióticos, de acción bactericida (principalmente aminoglucósidos y beta-lactámicos) puede ser necesario efectuar una evaluación cuantitativa del efecto bactericida.

La relación de la CMB con la CMI se ha convertido en una cuestión de interés práctico y científico, especialmente cuando se obtienen valores de CMB 32 ó más veces mayores que la CMI con una combinación dada microorganismo-bactericida. (11)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL .-Conocer el patrón de sensibilidad a los diversos antimicrobianos que presentan las cepas bacterianas de importancia clínica, conservadas en el cepario microbiano, instalado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, así como su concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).

OBJETIVOS PARTICULARES:

-Determinar la sensibilidad a los diversos antimicrobianos de doce cepas de bacterias Gram positivas y doce cepas de bacterias Gram negativas, por el método de Kirby Bauer en placa (recientemente comercializado) y el método de Difusión en Agar con sensidiscos.

-Establecer que método para determinar la sensibilidad a antimicrobianos es más apropiado para su uso en el cepario bacteriano de la Facultad de ciencias Químicas de la UASLP.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas por la microtécnica comercial UNICEP, así como también la concentración mínima bactericida (CMB).

- Apoyar a los docentes de la materia Bacteriología Médica, a la difusión entre los estudiantes que cursan la materia de Bacteriología Médica, del conocimiento y manejo de las CMI y las CMB, en relación a las diversas concentraciones que alcanzan los antibióticos en cada uno de los sitios anatómicos.

- Proporcionar datos acerca de la sensibilidad a antimicrobianos de los diferentes cepas conservadas en el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas U.A.S.L.P.

- Sentar un precedente de los diversos datos de la sensibilidad, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para observar posibles mutaciones que se llevaran a cabo en un futuro, a raíz de los métodos utilizados para su conservación.

MATERIAL BIOLÓGICO

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS:

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Citrobacter sp
Enterobacter aerogenes
Escherichia coli
Hafnia sp
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumonie
Klebsiella pneumonie capsulada
Proteus mirabilis
Proteus vulgaris
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella typhi
Serratia sp

BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Corinebacterium sp
Enterococcus avium
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Micrococcus sp
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus hominis
Staphylococcus saprophyticus
Staphylococcus simulans
Streptococcus pyogenes

EQUIPOS Y REACTIVOS

Vortex

Hisopos estériles

Unidiscos que contienen los antibióticos

Estandar de dilución No. 0.5 de Mac Farland

Tubos con 9 ml de solución salina al 0.85%

Medios de cultivo:

Agar sangre

Agar Mueller-Hinton

Agar Nutritivo

Agar de Kligler

Agar Mac Conkey

Agar de Citrato de Simmons

Agar de SIM

Agar de Fenilalanina

Agar de Hierro y Lisina

Agar MIO

Caldo Urea

Caldo Vogues-Proskauer

Reactivos:

Solución Madre de Cloruro de Calcio: Suplementar 0.005mg de Cloruro de Calcio en 100ml de Agar Mueller-Hinton.

Solución Madre de Cloruro de Magnesio: Suplementar 0.010mg de Cloruro de Magnesio en 100ml de Agar Mueller-Hinton.

Reactivo de Kovack

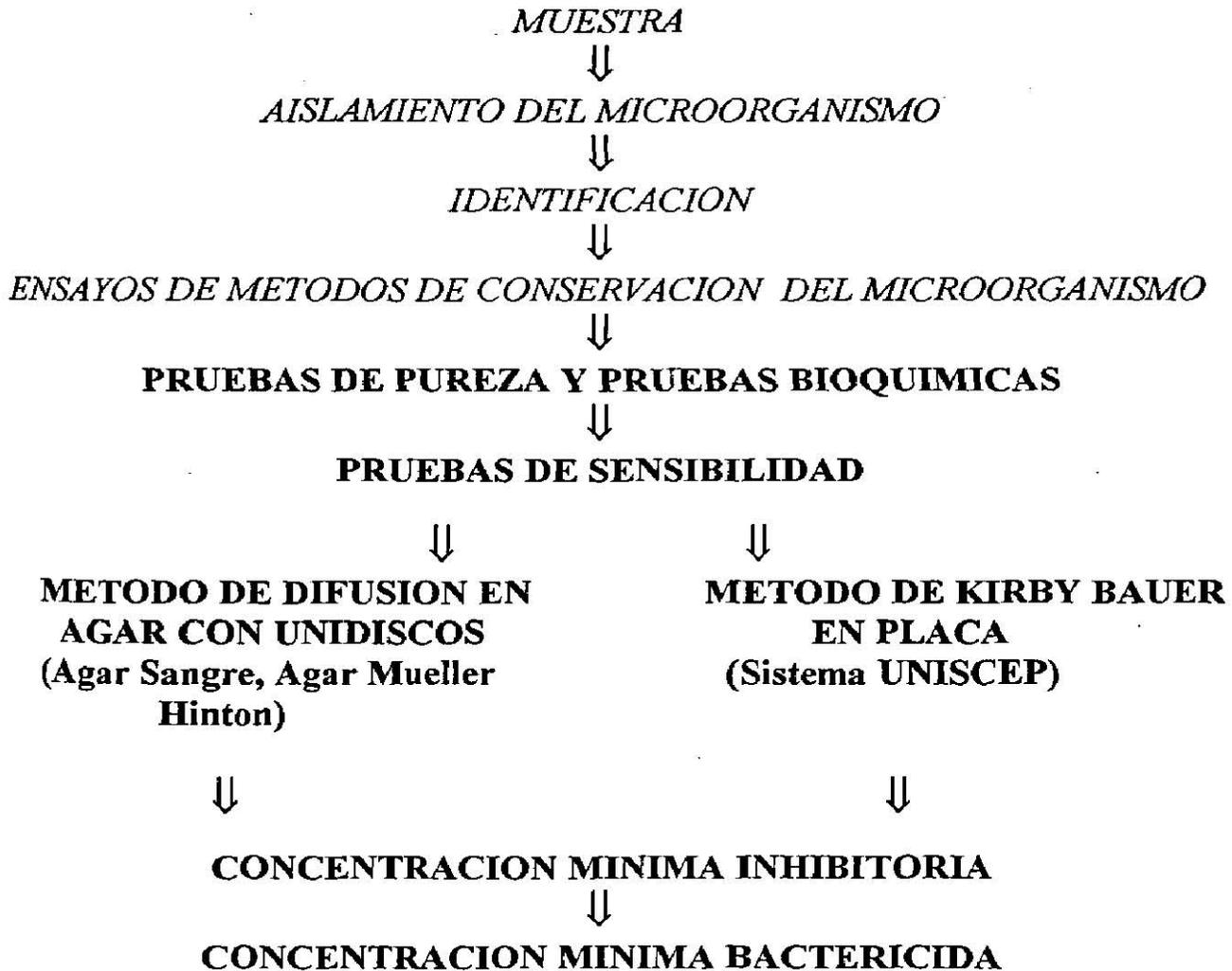
Rojo de Metilo

Hidróxido de Potasio al 40 %

Alfa naftol

Cloruro Férrico

METODOLOGIA



PROCEDIMIENTO

Las cepas de bacterias de importancia médica conservadas en el cepario bacteriano de la Facultad de ciencias Químicas de la UASLP se recuperaron, por subcultivos en caldos de los medios de soporte de preservación. Posteriormente se determinó la pureza de las cepas bacterianas, ésta se llevó a cabo haciendo una resiembra en agar de Mac Conkey y agar sangre para comprobar el desarrollo de un solo grupo bacteriano con base en la uniformidad de las colonias, tinción de Gram y corroborando por medio de su actividad bioquímica.

Los medios usados para probar la actividad bioquímica fueron los siguientes:

A).-Medios sólidos.

Agar hierro Kligler
Citrato de simmons
SIM
Fenilalanina
LIA

B).- Medios semisólidos

MIO

C).-Medios líquidos

Urea
Vogues-Proskauer

En los medios sólidos se sembró por estría (citrato de Simmons, Fenilalanina, LIA, KIA), por picadura (Urea, Vogues-Proskauer), por inoculación (MIO Y SIM). Se incubaron en estufa bacteriológica a 37°C por un período de 24 a 48 horas. Al cabo de este tiempo se observó en cada uno lo siguiente:

-KIA.- Producción de ácido y gas por fermentación de los azúcares presentes, observándose un viraje de color del rojo al amarillo, la producción de ácido sulfhídrico produce un precipitado negro.

-Citrato de simmons.- Crecimiento bacteriano, (ya que algunas bacterias utilizan el citrato como única fuente de carbono) y producción de productos alcalinos, con cambios de color de verde a azul.

-Urea.- Cambio de color debido a la presencia de ureasa bacteriana.

-SIM.- Producción de ácido sulfhídrico y motilidad.

-Indol.- Se empleo el Medio de SIM; al cual se le agregó unas gotas del reactivo de Kovack para observar el anillo de color rojo en la interfase, el cual nos indica si se degradó ó no el triptófano.

-Voges-Proskauer.- Se dividió el caldo en dos tubos, en el primer tubo se agregaron unas gotas de Rojo de Metilo, el cual nos indica si hay producción de ácidos mixtos en cantidad suficiente para observar el viraje de color rojo; Al segundo tubo se le agregaron unas gotas de Hidróxido de Potasio y alfa naftol, observandose si hay ó no la presencia de Acetilmethylcarbinol por formación de un complejo color rojo.

-LIA.- En esta prueba se observa si hay descarboxilación del aminoácido ya que ésta libera aminas alcalinas, que dan un color rojo púrpura intenso.

-Fenilalanina.- En ésta prueba se le agregan unas gotas de Cloruro férrico al medio y lo que se observa es si hay presencia de ácido fenilpirúvico; éste es un producto de degradación de la fenilalanina que forma un color verde en la superficie.(1, 5)

Una vez obtenido el perfil de cada cepa se identifican género y especie en una tabla de pruebas bioquímicas.

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

A las cepas puras y cuyo patrón bioquímico ya ha sido probado se les determinó la susceptibilidad ante los antibióticos usando dos métodos:

- 1).- Método de difusión en Agar con Discos.
- 2).-Prueba de susceptibilidad Kirby-Bauer en placa.

1)- MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS

Procedimiento:

1.1.- Preparar el medio de Agar Mueller-Hinton de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El pH final a temperatura ambiente deberá estar entre 7.2 y 7.4. Adicionar 0.005 mg de la sal de Cloruro de calcio en 100 ml. de Agar de Mueller-Hinton, y 0.01 mg de la sal de Cloruro de magnesio en 100 ml. de agar de Mueller-Hinton.

1.2.- Colocar 25ml. del medio en cajas de Petri de 90mm. de diámetro ó 60 ml en cada caja de 140 mm de diámetro, de tal forma que la profundidad sea de 4 mm. Para microorganismos exigentes, puede agregársele al medio sangre desfibrinada al 5% de borrego, de caballo o de otro animal.

1.3.- Tomar con un asa 4 ó 5 colonias aisladas del mismo tipo morfológico e inocular en 4 ó 5 ml de solución salina, la turbidez se ajusta hasta tener una densidad comparable con el estándar de Mac Farland No. 0.5

1.4.- Para inocular el agar se utiliza un hisopo de madera y algodón, el cual se humedece con la suspensión, se quita el exceso del caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, por arriba del nivel del caldo. Se estría el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo uniforme.

Se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri. Cuando el inóculo ha secado (de 3 a 4 min) se procede a colocar los discos.

1.5.- Los discos se toman con pinza estéril y se colocan en el medio en un período menor de 15 min. después de haber inoculado la placa. Los discos deberán presionarse ligeramente para asegurar un contacto completo con la superficie. Se deberá prevenir una sobre posición de las zonas de inhibición con una distribución adecuada de los discos y con un límite no menor de 15mm. de los bordes de la placa .

1.6.- Después de 15 min. de haber colocado los discos, se invierte la caja de Petri y se incuba a 35°C. El tiempo de incubación es de 16 a 18 horas.

1.7.- La medida de los halos de inhibición se hace con una regla, por el fondo de la caja la cuál se ilumina con luz reflejada. Cuando se utilizó el medio de agar sangre, la lectura se efectúa sobre la superficie del agar.

Los antibióticos que fueron utilizados en este método se observan en los cuadros 1 y 2

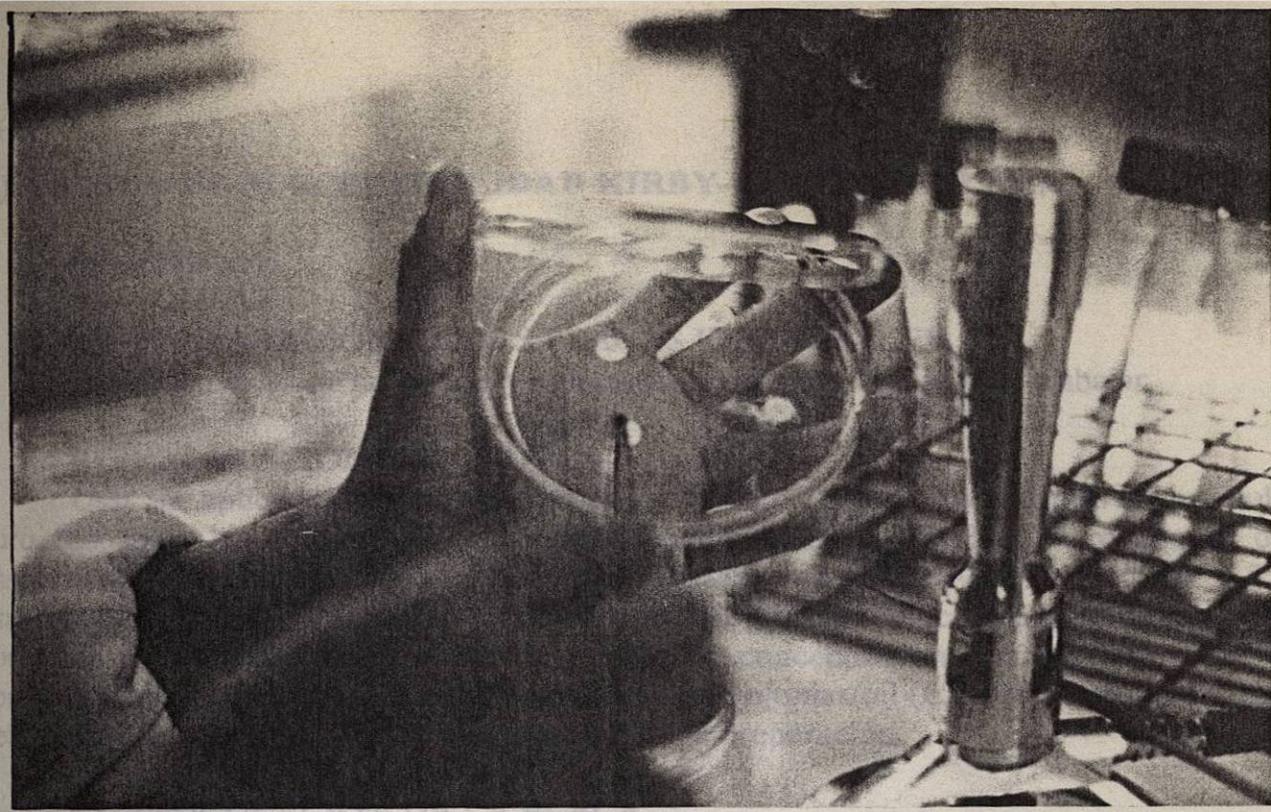
CUADRO 1 ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

ANTIBIÓTICOS	ABREVIATURAS	CONCENTRACIÓN (mcg)
Amikacina	AN	30
Ampicilina	AM	10
Acido Nalidixico	NA	30
Carbencilina	CB	100
Cefotaxime	CTX	30
Cloranfenicol	C	30
Colistina	CL	10
Gentamicina	GM	10
Kanamicina	K	30
Neomicina	N	30
Nitrofurantoina	F/M	100
Polimixina B	PB	300 units
Tetraciclina	Te	30
Trimethoprim Sulfamethoxazol	SXT	1.25 23.75

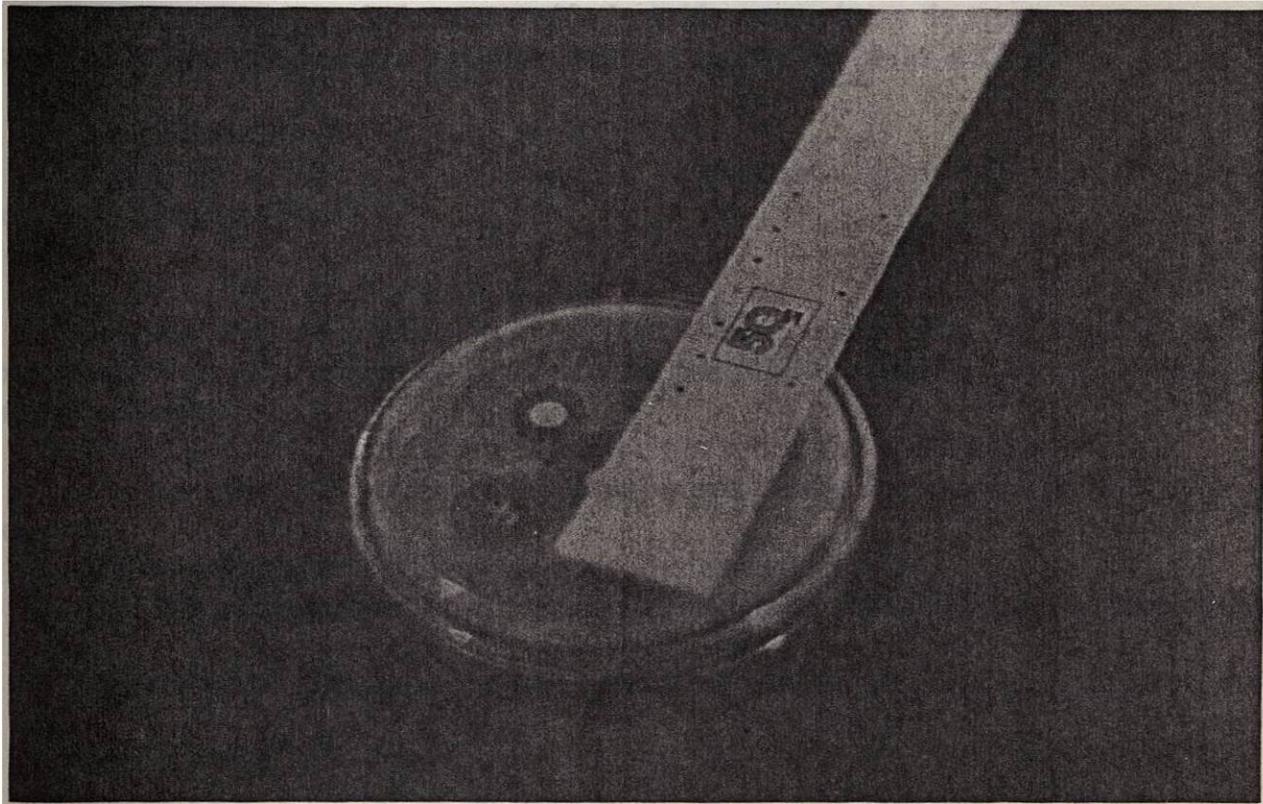
CUADRO 2 ANTIBIOTICOS UTILIZADOS PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS

ANTIBIOTICOS	ABREVIATURA	CONCENTRACION mcg
Cephalotin	CF	30
Cloxacilina	CX	1
Eritromicina	E	15
Lincomicina	L	2
Penicilina	P	10 units
Rifampin	RA	5
Estreptomicina	S	10

Después de haber llevado a cabo este método se vuelve a realizar las pruebas de pureza de las cepas bacterianas por pruebas bioquímicas.(1, 7, 17)



Colocación de los sensidiscos impregnados con antibióticos sobre la superficie de una placa de Agar de Mueller Hinton que ha sido inoculada con el organismo en estudio.



Medición de los halos de inhibición obtenidos por la difusión del antibiótico en el medio de Mueller-Hinton

II).-PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD KIRBY-BAUER EN PLACA

Procedimiento:

A).- PREPARACIÓN DE LAS PLACAS KIRBY-BAUER

Sacar las placas de las bolsas y colocarlas en el lugar que se va a trabajar.

B).PREPARACIÓN DEL INOCULO

Usar un aplicador estéril, seleccionar suficiente número de colonias de un cultivo puro, suspender las colonias en 5 ml. de solución salina al 0.85% Los resultados de la suspensión se estandarizan con el equivalente estándar de turbidez Mac Farland No. 0.5.. Se usa pipeta estéril para preparar la dilución 1:100 de una inoculación, en un volumen apropiado de solución salina al 0.85% estéril; La concentración final de éste inóculo es aproximadamente 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias/ml (CFU/ml). Esta preparación debe usarse en un margen de 15 min. después de la preparación.

C).- INOCULACIÓN DE LA PLACA

1.- Con una pipeta Pasteur estéril se toma una muestra de la suspensión y se inoculan 100 microlitros en cada uno de los pozos.

2.- Usar el exceso de la suspensión bacteriana en placas de agar sangre y agar MacConkey; como un verificador de pureza, incubar de 24 a 48 horas a 37° C.

D).-INCUBACION DE LAS BANDEJAS

1.-Incubar las placas en un incubador de cámara o equivalente por 18 -24 horas a una temperatura de 35 a 37°C.

E).-LECTURA DE LAS PLACAS

Después de la incubación, las placas son leídas por la capacidad de los microorganismos para crecer en presencia de los antimicrobianos. El crecimiento puede presentarse como:

-Denso o turbio; distribución uniforme por todas partes del pozo

-Concentrado o difusamente abotonamientos de crecimiento bacteriano en el fondo del pozo.

-Difusión de bacterias dispersas por todas partes del pozo.

La ausencia de cualquier turbidez esta considerado como ausencia de crecimiento.

Los antibióticos utilizados en este método se pueden observar en el cuadro 3 y 4

CUADRO 3
ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS POR EL
MÉTODO KIRBY - BAUER

ANTIBIÓTICOS	ABREVIATURA	CONCENTRACIÓN (mcg/ml)	
		B	A
Penicilina	P	8	0.1
Ampicilina	AM	8	0.25
Amoxicilina/ácido Clavulanico	AM/C	8/4	16/8
Nitrofurantina	F/M		25
Ampicilina /Sulbactam	SAM	8/4	16/8
Oxacilina	OX	2	4
Eritromicina	E	0.5	4
Clindamicina	CC	0.5	2
Rifampin	RA	1	2
Vancomicina	Va	4	16
Trimethoprin Sufamethoxazol	SXT	2 /38	4/76
Ciprofloxacina	CIP	1	2
Norfloxacina	NOR	4	8
Gentamicina	GM	4	8
Amikacina	AN	16	32
Cephalothin	CF	8	16
Cloranfenicol	C	8	16
Tetraciclina	Te	4	8
Imipenem	IPM	4	8

B = BAJA CONCENTRACION
A= ALTA CONCENTRACION

CUADRO 4

ANTIBIOTICOS UTILIZADOS PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

ANTIBIÓTICOS	ABREVIATURA	CONCENTRACIÓN (mcg/ml)	
		B	A
Trimethoprin /Sulfamethoxazol	SXT	2/38	4/76
Norfloxacin	NOR	4	8
Ciprofloxacina	CIP	1	2
Ampicilina	AM	8	16
Ampicilina Sulbactam	SAM	8/4	16/8
Acido Clavulanico/Ticarcilina	TIM	16/2	64/2
Piperacilina	PIP	16	64
Cefazolina	CZ	8	16
Cefuroxime	CXM	8	16
Cefotetan	CTT	16	32
Cefoperazon	CFP	16	32
Cefotaxim	CTX	8	32
Ceftriaxom	CRO	8	32
Ceftaxidim	CAZ	8	16
Amikacina	AN	16	32
Gentamicina	GM	4	8
Tobramicina	NN	4	8
Aztreonam	ATM	8	16
Imipenem	IPM	4	8

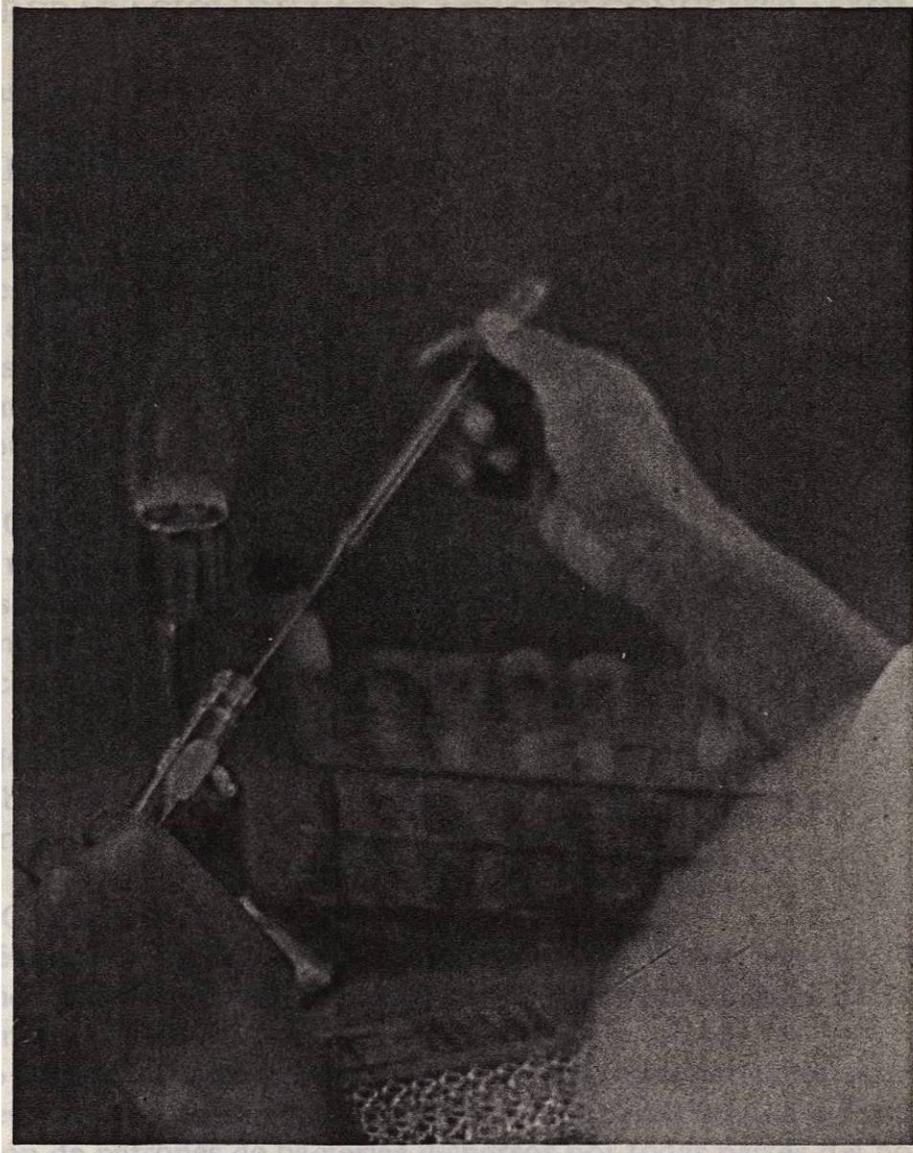
B= BAJA CONCENTRACION
A= ALTA CONCENTRACION

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Los resultados se interpretan mediante la observación del desarrollo bacteriano en los pozos correspondientes a cada antibiótico presente en dos concentraciones.

<i>BAJA CONCENTRACIÓN</i>	<i>ALTA CONCENTRACIÓN</i>	<i>INTERPRETACIÓN</i>
Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sensible
Desarrollo	Sin desarrollo	Intermedio
Desarrollo	Desarrollo	Resistente
Sin desarrollo	Desarrollo	No válido

-Después de haber llevado a cabo este método, se les realizarón pruebas de pureza y pruebas bioquímicas las cepas bacterianas para observar el desarrollo uniforme de colonias; y además de pruebas bioquímicas.(15)



Inoculación de una cepa bacteriana en la placa de Kirby-Bauer

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Procedimiento:

A).- PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

Sacar las placas de las bolsas y colocarlas en el lugar que se va a trabajar.

B).- PREPARACIÓN DEL INOCULO

Usar un aplicador estéril; seleccionar suficiente número de colonias de un cultivo puro; suspender las colonias en 5 ml. de solución salina al 0.85%; los resultados de la suspensión se estandarizan con el equivalente estándar de turbidez de Mac Farland No. 0.5. Se usa pipeta estéril para preparar la dilución 1:100 de una inoculación en un volumen apropiado de solución salina al 0.85% estéril; la concentración final de este inocular es aproximadamente 1×10^6 CFU/ml. Esta inoculación debe usarse en un margen de 15 min. después de la preparación.

C).- INOCULACIÓN DE LA PLACA

1.-Con una pipeta Pasteur estéril se toma una muestra de la suspensión y se inoculan 100 microlitros aproximadamente en cada uno de los pozos.

2.- Sembrar el exceso de la suspensión bacteriana en placas de agar sangre y agar Mac Conkey; como un verificador de pureza, incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

D).- INCUBACIÓN DE LAS BANDEJAS

1.-Incubar las placas en un incubador de cámara o equivalente por 18-24 horas a una temperatura de 35-37° C

E).-LECTURA DE LAS PLACAS

Después de la incubación; las bandejas son leídas por la capacidad de los microorganismos para crecer en presencia de los antimicrobianos. El crecimiento puede presentarse como:

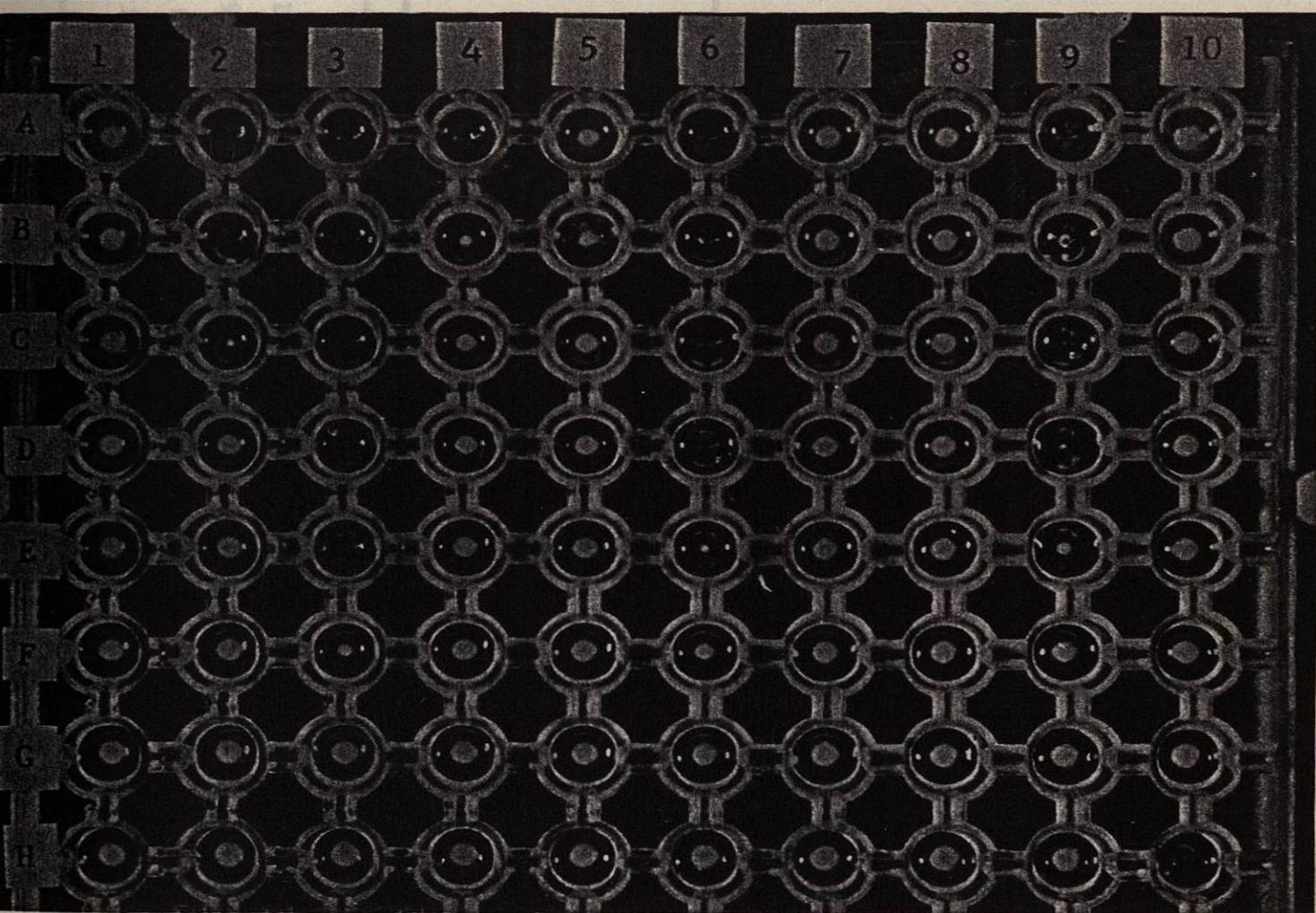
-Denso ó igual; uniformemente distribuido por todas partes del pozo.

-Concentrado abotonamientos de crecimiento bacteriano en el fondo del pozo.

-Difusión de patrones de bacterias dispersos por todas partes del pozo.

La ausencia de cualquier turbidez esta considerado como ausencia de crecimiento.

Observar la figura No. 1, 2.



La figura 1. Es una microplaca que fue utilizada para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas. Los números de la parte superior indican los diferentes antibióticos ensayados, las letras a lo largo de la hilera vertical izquierda nos indican la concentración de antibióticos contenida en cada concavidad. La presencia de un botón de desarrollo bacteriano en cualquier concavidad indica Resistencia a esa concentración de antibiótico; y su siguiente concavidad nos indica su concentración inhibitoria ó bactericida.

INTERPRETACION DE RESULTADOS EN LAS TABLAS DE CMI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	2	1	1	1	0.5	4	1	2	0.5/9.5	4	4
B	4	2	2	2	1	8	2	4	1/19	8	8
C	8	4	4	4	2	16	4	8	2/38	16	16
D	16	8	8	8	4	32	8	16	4/76	32	32
									8/152		

INTERPRETACION

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0	⊗	0	0	⊗	0	0	0	⊗	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊗
C	0	0	0	0	0	⊗	⊗	0	0	0	0
D	⊗	0	0	0	0	0	0	0	0	⊗	0

FIGURA 2

- CMI Columna 1 = 16 µg/ml (concentración del pozo más claro)
- CMI Columna 2 = menor que ó igual a 1 µg/ml (todos los pozos están claros)
- CMI Columna 3 = mayor que 8 µg/ml (crecimiento en todas las diluciones)
- CMI Columna 4 = mayor que 8 µg/ml (ignorar el brinco del pozo)
- CMI Columna 5 = menor que ó igual a 0.5 µg/ml (ignorar las altas contaminaciones de un solo antimicrobiano, si mas de un antimicrobiano demuestra alta contaminación repetir la prueba de CMI)
- CMI Columna 6 = 16 µg/ml (estrella mostrada en los pozos A y B)
- CMI Columna 7 = 4 µg/ml (muestra la difusión del crecimiento)
- CMI Columna 8 = doble brinco; repetir la prueba
- CMI Columna 9 = menor que ó igual 0.5 / 9.5 µg/ml (extremadamente pequeños los botones en todos los pozos algunas veces son encontrados con Trimethoprim/Sulfametoxazol indicando los límites de crecimiento dentro de los principios bacteriostáticos. éste tipo de crecimiento es indiferente y las concentraciones más bajas son reportadas)
- CMI Columna 10 = 32 µg/ml (pálides en la punta la cual desaparece)
- CMI Columna 11 = 8 µg/ml (pálides en la punta la cual persiste)

ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA Y TIPOS DE BACTERIAS CON LOS QUE SE RECOMIENDA SU USO

ANTIMICROBIANOS	ABREVIATURA	CONCENTRACIÓN (mcg/ml)	GRAM NEGATIVOS	GRAM POSITIVOS
Penicilina	P	0.03 - 8		X
Oxacilina	OX	0.5 - 4		X
Eritromicina	E	0.5 - 4		X
Clindamicina	CC	0.5 - 4		X
Vancomicina	Va	2 - 16		X
Gentamicina	GM	1 - 8	X	X
Tobramicina	NN	1 - 8	X	X
Amikacina	AN	4 - 32	X	X
Acido clavulanico/Ticarcilina	TIM	16/2 - 128/2	X	X
Timethoprin /Sulfamethoxazol	SXT	0.5/9.5 8/152	X	X
Ampicilina	AM	0.12 - 16	X	X
Ampicilina /Sulbactam	SAM	2/1 -16/8	X	X
Amoxicilina/Acido clavulanico	AM/C	2/ 1 - 16/8	X	X
Cephalothin	CF	2 - 16	X	X
Imipenem	IPM	1 - 8	X	X
Ciprofloxacina	CIP	0.5 - 4	X	X
Mezlocilina	MZ	16 - 128	X	
Aztreonam	ATM	2 - 16	X	
Piperacilina	PIP	8 - 128	X	
Norfloxacin	NOR	4 - 16	X	X
Cefazolina	CZ	2 - 16	X	
Cefuroxim	CXM	2 - 16	X	
Cefoxitin	FOX	2 - 16	X	
Cefoperazon	CFP	4 - 32	X	
Ceftazidim	CAZ	2 - 16	X	
Cefotaxim	CTX	4 - 32	X	
Ceftriaxom	CRO	4 - 32	X	X

F).- DETERMINACIÓN DE CMB.

1.- Los pozos que no presentan desarrollo visible se muestrean para la determinación de CMB. Tomar una asada y diseminarla con un asa calibrada estéril en placas de Agar Sangre para Bacterias Gram positivas; y en Agar Mac Conkey para Bacterias Gram negativas.

2.- Incubar las placas de 18 - 24 horas a 37°C

3.- Contar las colonias de las placas de CMB; cualquier número menor ó igual al que representa el 0.1% del inóculo original, se considera el resultado 99.9% letal ó bactericida. (14)

- La determinación de concentración mínima bactericida se hace después de obtener los resultados de la concentración mínima inhibitoria, inoculando en cajas de Petri con agar Sangre o Nutritivo las muestras correspondientes a una dilución del antibiótico anterior a la que se determinó como CMI y todas las posteriores.

RESULTADOS

Las cepas bacterianas conservadas en el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas se expusieron a diversos antimicrobianos para determinar los patrones de sensibilidad - resistencia de cada una de las cepas, usando el método de Difusión en agar con sensidiscos (Tablas no.1 y 2 Gráfica no. 1, 2, 3, 4) y el método Kirby Bauer en placa (Tablas no. 3 y 4 Gráficas no 5, 6, 7, 8). Comparándose ambos métodos en cuanto a la respuesta de la cepa bacteriana a los antimicrobianos (Tablas no. 5 y 6). La CMI y la CMB (Tabla no. 7 Gráfica no. 9 y 10) se determinaron mediante la aplicación de la microtécnica UNICEP - MIC tipo-3 .

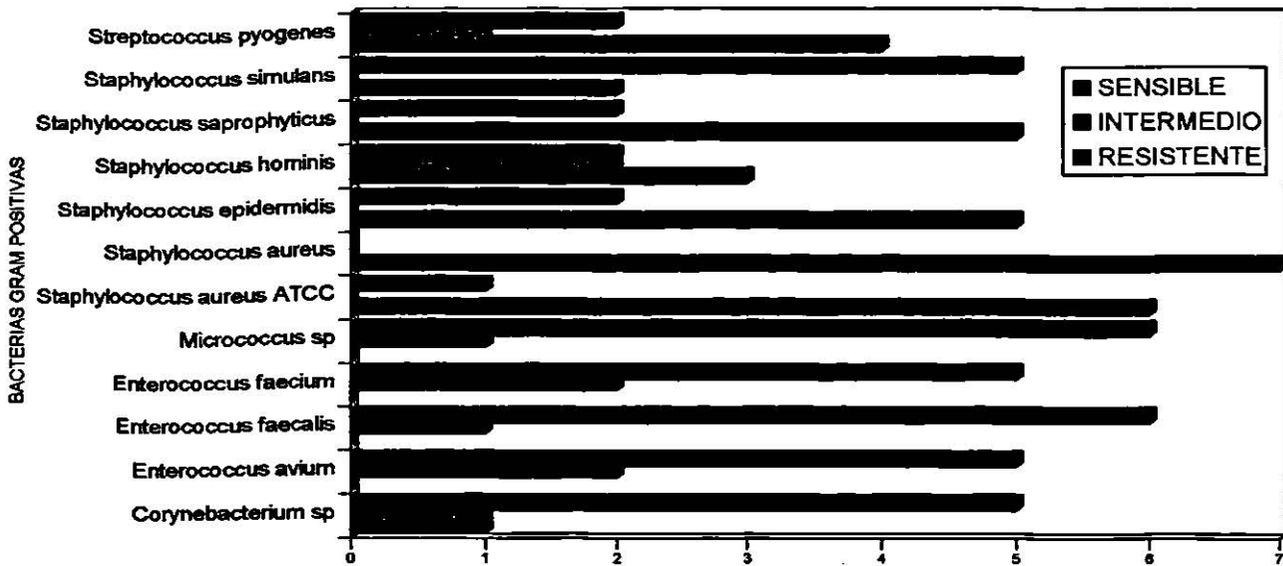
TABLA 1

PATRONES DE SENSIBILIDAD - RESISTENCIA OBTENIDOS POR EL METODO UNIDISCOS DE BACTERIAS
GRAM POSITIVAS

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	CF	CX	E	L	P	RA	S
<i>Corynebacterium</i> sp	R	R	I	S	R	R	R
<i>Enterococcus avium</i>	I	R	I	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	I	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecium</i>	I	R	I	R	R	R	R
<i>Micrococcus</i> sp	R	R	R	R	R	R	I
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	R	S	R
<i>Staphylococcus hominis</i>	I	S	S	I	R	S	R
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	S	S	S	R	S	R
<i>Staphylococcus simulans</i>	S	R	R	R	R	R	S
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S	S	S	I	S	R	R

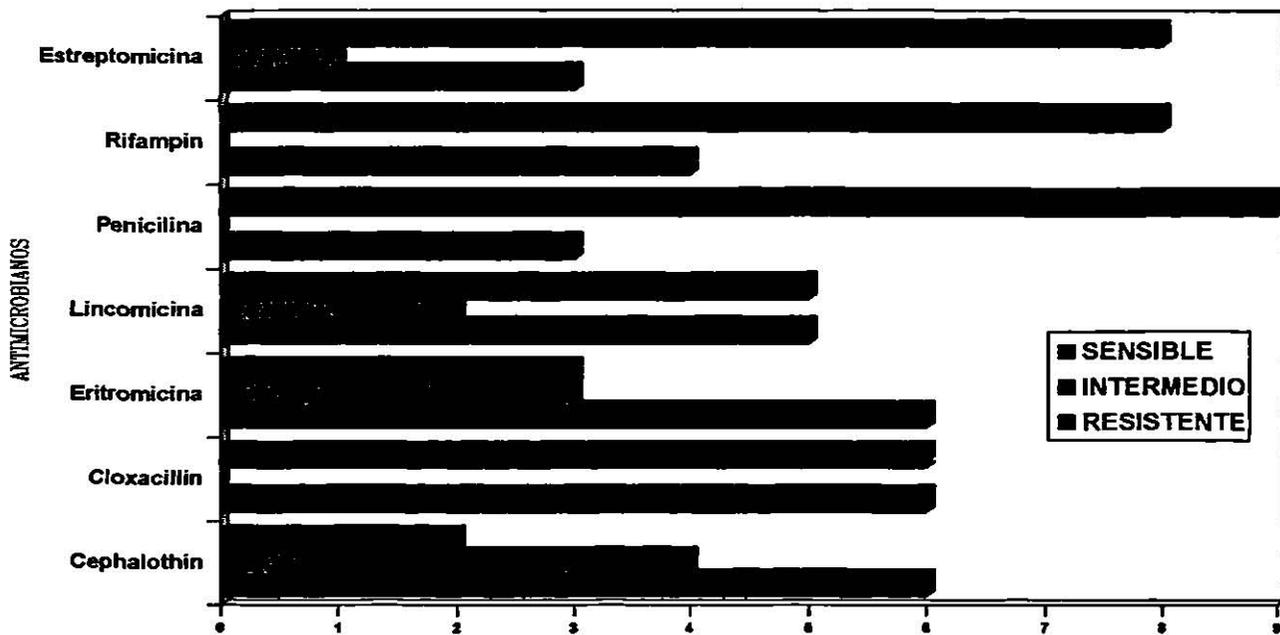
S = SENSIBLE
I = INTERMEDIO
R = RESISTENTE

**SENSIBILIDAD CON UNDISCOS
GRAFICA 1**



RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

**SENSIBILIDAD CON UNIDISCOS
GRAFICA 2**



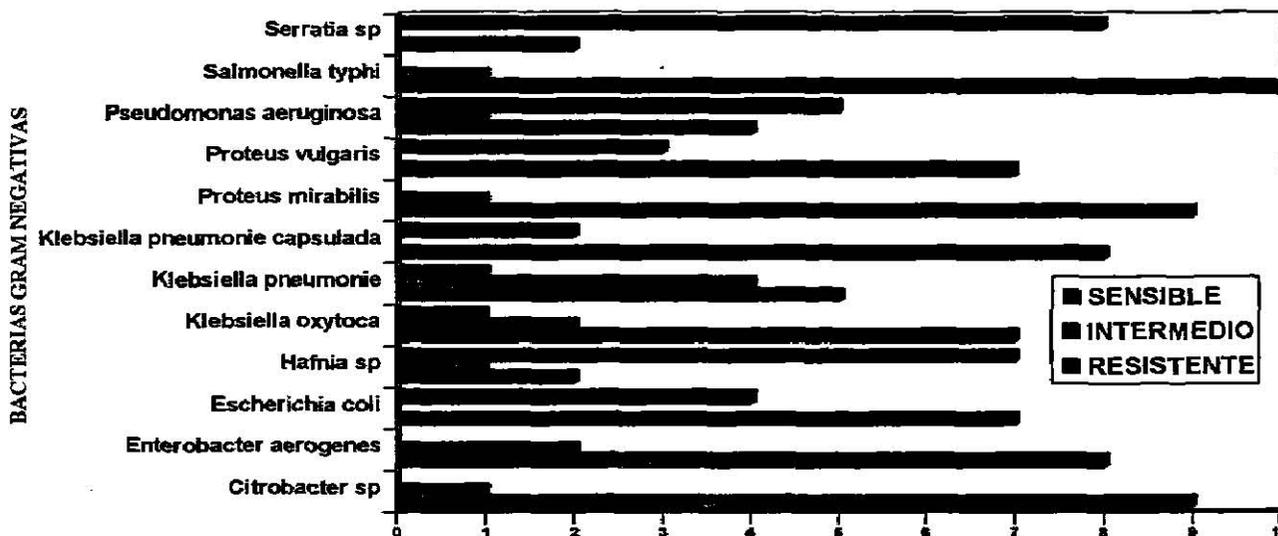
RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE ANTIMICROBIANOS

TABLA 2
PATRONES DE SENSIBILIDAD - RESISTENCIA OBTENIDOS POR EL METODO UNIDISCOS DE BACTERIAS
GRAM NEGATIVAS

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	AN	AM	NA	CB	CTX	C	CL	GM	K	N	F/M	PB	Te	SXT
<i>Citrobacter sp</i>	S	S		I	S			S	S	S	S		S	S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S		S	S			S	S	I	S		I	S
<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S			S	S	S	S		R	R
<i>Hania sp</i>	I	R		R	S			R	R	S	R		R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S		S	S			S	I	I	S		S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	I		R	S			S	S	S	I		I	I
<i>Klebsiella pneumoniae capsulada</i>	S	R		R	S			S	S	S	S		S	S
<i>Proteus mirabilis</i>	S	S		I	S			S	S	S	S		S	S
<i>Proteus vulgaris</i>	S	S		S	S			S	S	S	R		R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R		S	S			S	R	I	R	S	R	R
<i>Salmonella typhi</i>	S	S		S	S	S	R	S	S	S	S		S	I
<i>Serratia sp</i>	R	R		R	S			R	R	S	R		R	R

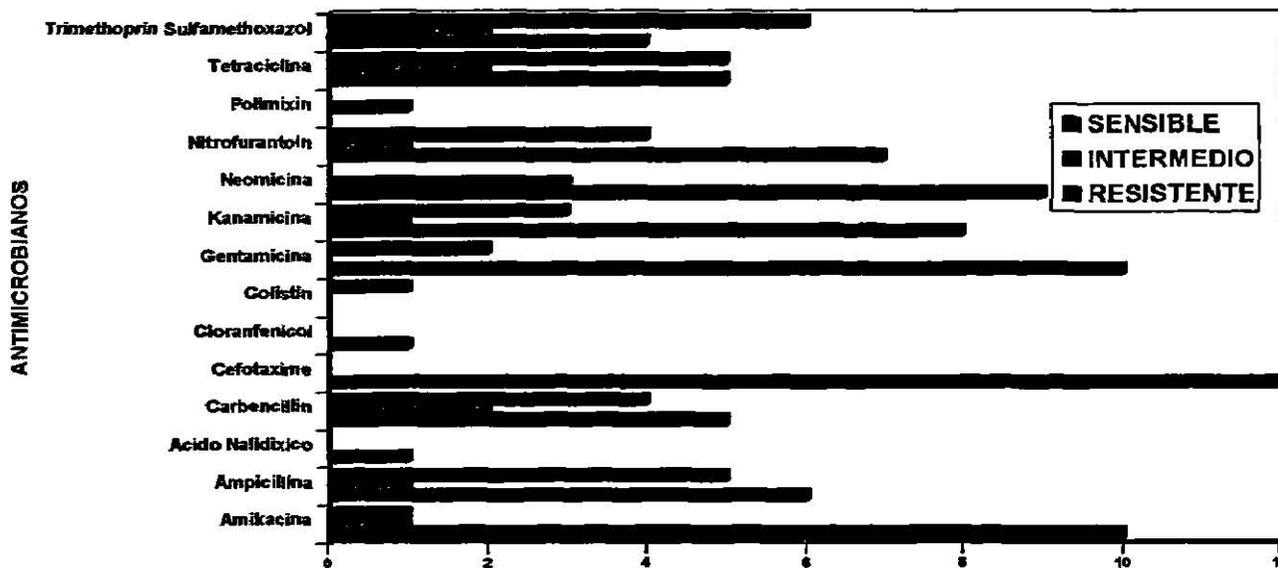
S = SENSIBLE
I = INTERMEDIO
R = RESISTENTE

**SENSIBILIDAD CON UNIDISCOS
GRAFICA 3**



RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

**SENSIBILIDAD CON UNIDISCOS
GRAFICA 4**



RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE ANTIMICROBIANOS

TABLA 3

PATRONES DE SENSIBILIDAD - RESISTENCIA OBTENIDOS POR EL METODO KIRBY - BAUER EN PLACA DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

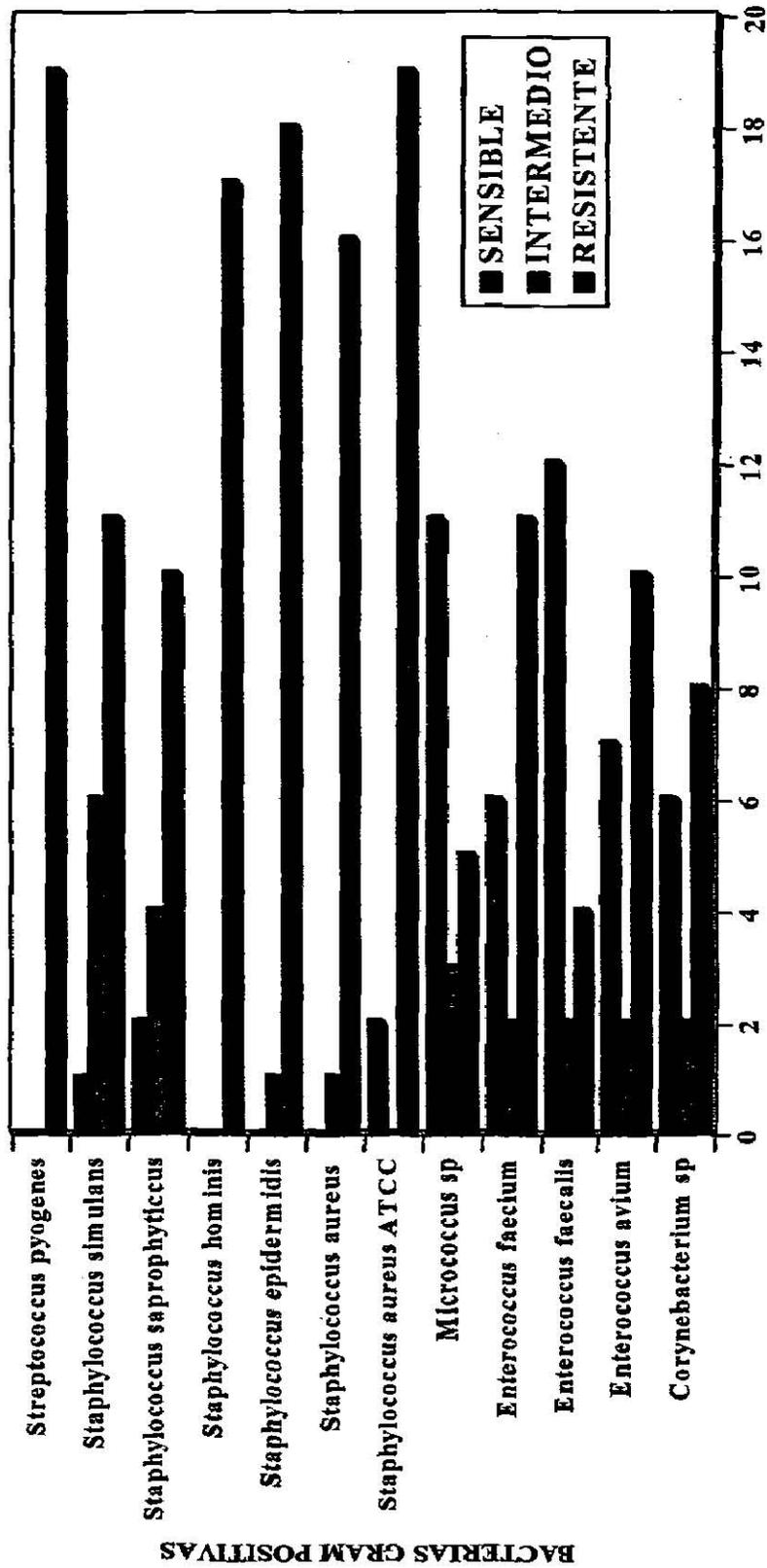
BACTERIAS GRAM POSITIVAS	P	AM	AM/C	F/M	SAM	OX	E	CC	RA	Va	SXT	CIP	NOR	GM	AN	CF	C	Te	IPM
<i>Corynebacterium sp</i>			S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	I	I	S	R	S	S	
<i>Enterococcus avium</i>	R	R	S	S	S	R	I	R	S	I	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R		R	I	R	R	S
<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	R	S	S	I	R	R	S
<i>Micrococcus sp</i>	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	R	R	R	S
<i>Staphilococcus aureus ATCC 25923</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphilococcus aureus</i>			S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphilococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Saphilococcus hominis</i>			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphilococcus saprophiticcus</i>			S	S	S	R		R	S	I	S	I	I	I	S	S	S	S	S
<i>Staphilococcus simulans</i>	R		S	S	S	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S = SENSIBLE

I = INTERMEDIO

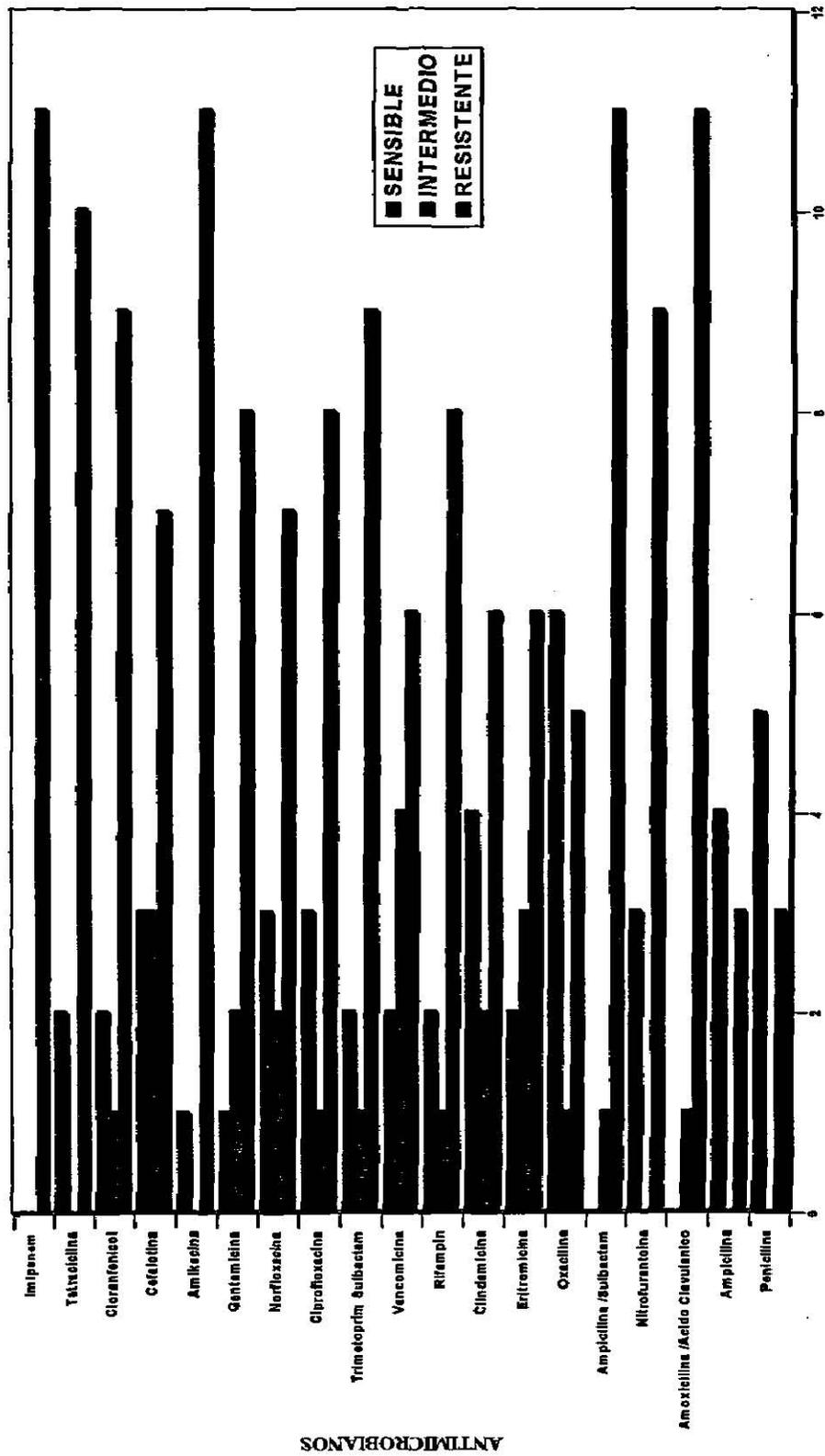
R = RESISTENTE

**METODO KIRBY - BAUER
GRAFICA 5**



RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

**METODO KIRBY - BAUER
GRAFICA 6**



RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE ANTIMICROBIANOS

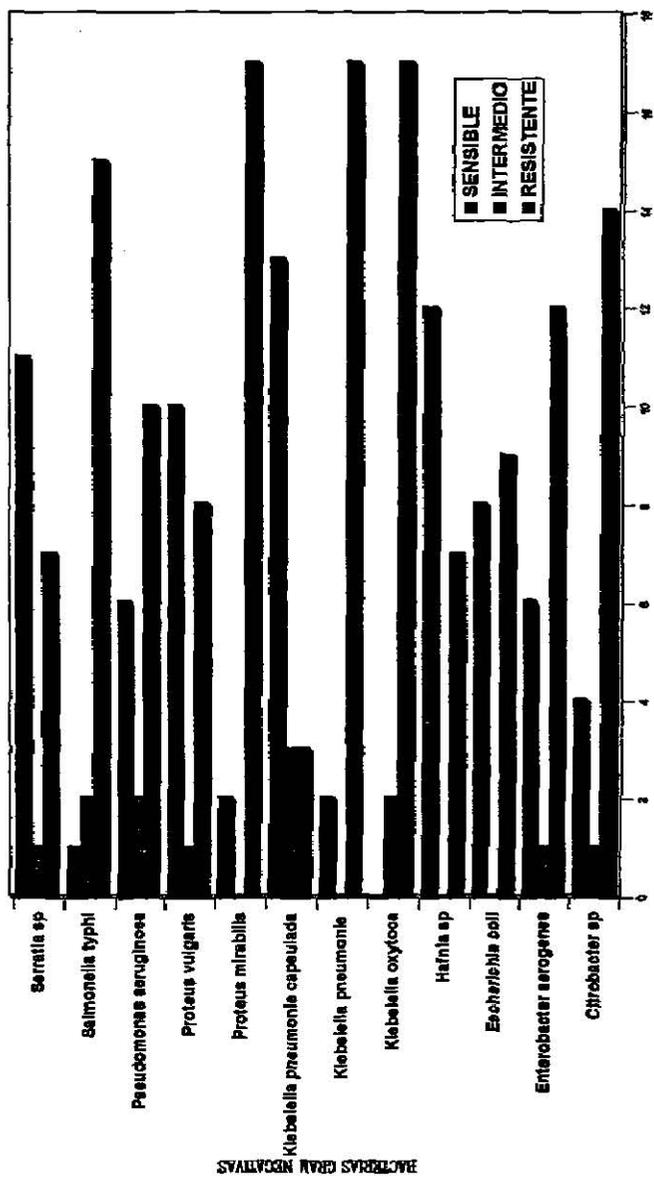
TABLA 4

PATRONES DE SENSIBILIDAD - RESISTENCIA OBTENIDOS POR EL METODO KIRBY - BAUER EN PLACA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	SXT	NOR	CIP	AM	SAM	TIM	PIP	CZ	CXM	CTT	CFP	CTX	CRO	CAZ	AN	GM	NN	ATM	IPM
<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter aerogenas</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S			R	S
<i>Hafnia sp</i>	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae capsulada</i>	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	I
<i>Proteus mirabilis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	I	S	S	R	R	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R		S	I	S	S	S	R	I	S
<i>Salmonella typhi</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S		R	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>Serratia sp</i>	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	I	R	S

S = SENSIBLE
 I = INTERMEDIO
 R = RESISTENTE

METODO KIRBY - BAUER
GRAFICA 7



RELACION SENSIBILIDAD - RESISTENCIA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

**METODO KIRBY - BAUER
GRAFICA 8**

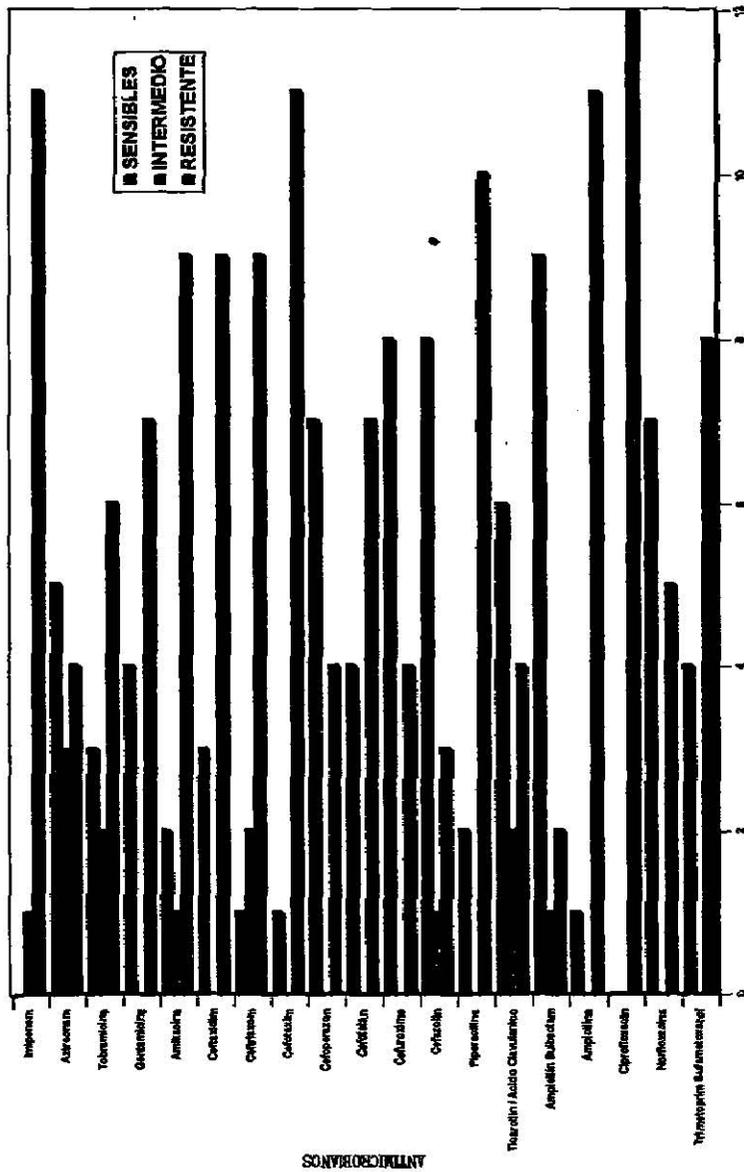


TABLA 5
COMPARACION DE RESULTADOS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS OBTENIDAS POR EL METODO KIRBY -
BAUER EN PLACA Y METODO UNIDISCOS

	SXT		AM		CTX		AN		GM	
	1.25 - 27.75mcg	2/38- 4/16mcg/ml	10mcg	8 - 16mcg/ml	30 mcg	8 -32 mcg/ml	30 mcg	16 - 32 mcg/ml	10 mcg	4 -8 mcg/ ml
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	UNIDISCO	KIRBY BAUER	UNIDIS COS	KIRBY BAUER	UNIDIS COS	KIRBY BAUER	UNIDIS COS	KIRBY BAUER	UNIDIS COS	KIRBY BAUER
<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Hafnia sp</i>	R	R	R	S	S	S	I	R	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I	S	I	S	S	S	S	I	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae capsulada</i>	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Salmonella tify</i>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia sp</i>	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R

S = SENSIBLE
I = INTERMEDIO
R = RESISTENTE

TABLA 6

COMPARACION DE RESULTADOS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS OBTENIDOS POR EL METODO KIRBY - BAUER EN PLACA Y KIRBY - BAUER CON UNIDISCOS.

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	CF		E		P		RA	
	30mcg UNIDISCOS	8-16 mcg/ml KIRBY BAUER	15mcg UNIDISCOS	0.5-4mcg/ml KIRBY BAUER	10 Units UNIDISCOS	8-0.1mcg/ml KIRBY BAUER	5mcg UNIDISCOS	1-2mcg/ml KIRBY BAUER
<i>Corynebacterium sp</i>	R	R	I	R	R		R	R
<i>Enterococcus avium</i>	I	S	I	I	R	R	R	S
<i>Enterococcus faecalis</i>	I	I	R	S	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecium</i>	I	I	I	S	R	R	R	S
<i>Micrococcus sp</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	I	S		S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>Staphylococcus hominis</i>	I	S	S	S	R		S	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	S	S	S	R		S	S
<i>Staphylococcus simulans</i>	S	I	R	I	R	R	R	I
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	R	S

S = SENSIBLE
I = INTERMEDIO
R = RESISTENTE

Tabla 7

	PENICILINA mcg/ml				NORFLOXACINA mcg/ml			OXACILLINA mcg/m		0.25	0.5	1
	1	2	4	8	4	8	16	0.5	2			
<i>Citrobacter sp</i>					I		B					
<i>Enterobacter aerogenes</i>						I - B						
<i>Escherichia coli</i>					I - B							
<i>Hafnia sp</i>					I - B							
<i>Klebsiella oxytoca</i>		I				I - B						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>												
<i>Klebsiella pneumoniae capsulada</i>					I							
<i>Proteus mirabilis</i>				I	I - B							
<i>Proteus vulgaris</i>					I - B							
<i>Pseudomonas aerogenes</i>		I			I - B							
<i>Salmonella typhi</i>					I - B							
<i>Serratia sp</i>			I									
<i>Enterococcus avium</i>		I	B				I			I		
<i>Enterococcus faecalis</i>		I - B					I - B					
<i>Enterococcus faecium</i>	I	B				I	B					
<i>Micrococcus sp</i>				I		I						
<i>Staphylococcus aureus</i>				I - B	I - B			I - B				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		I	B		I		B	I - B				
<i>Staphylococcus hominis</i>					I - B				I - B			
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		I - B				I - B						I - B
<i>Staphylococcus simulans</i>					I - B							
<i>Streptococcus pyogenes</i>		I - B			I - B							I - B

Relación de la concentración mínima inhibitoria y Bactericida de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

AMPICILINA mcg/ml					ERITROMICINA mcg/ml			AMPICILINA/SULBACTAM mcg/ml				CEFAZOLINA mcg/ml			
2	4	8	16		0.5	2	4	2/1	4/2	8/4	16/8	2	4	8	16
								- B							B
	- B								B				- B		
	B					B		- B							- B
	B						B	- B						- B	
				B		B		- B							
		- B					- B	- B				- B			
	- B				- B			- B				- B			
			- B		- B						B		B		
- B							- B	- B							
				B						- B				- B	
					- B							- B			

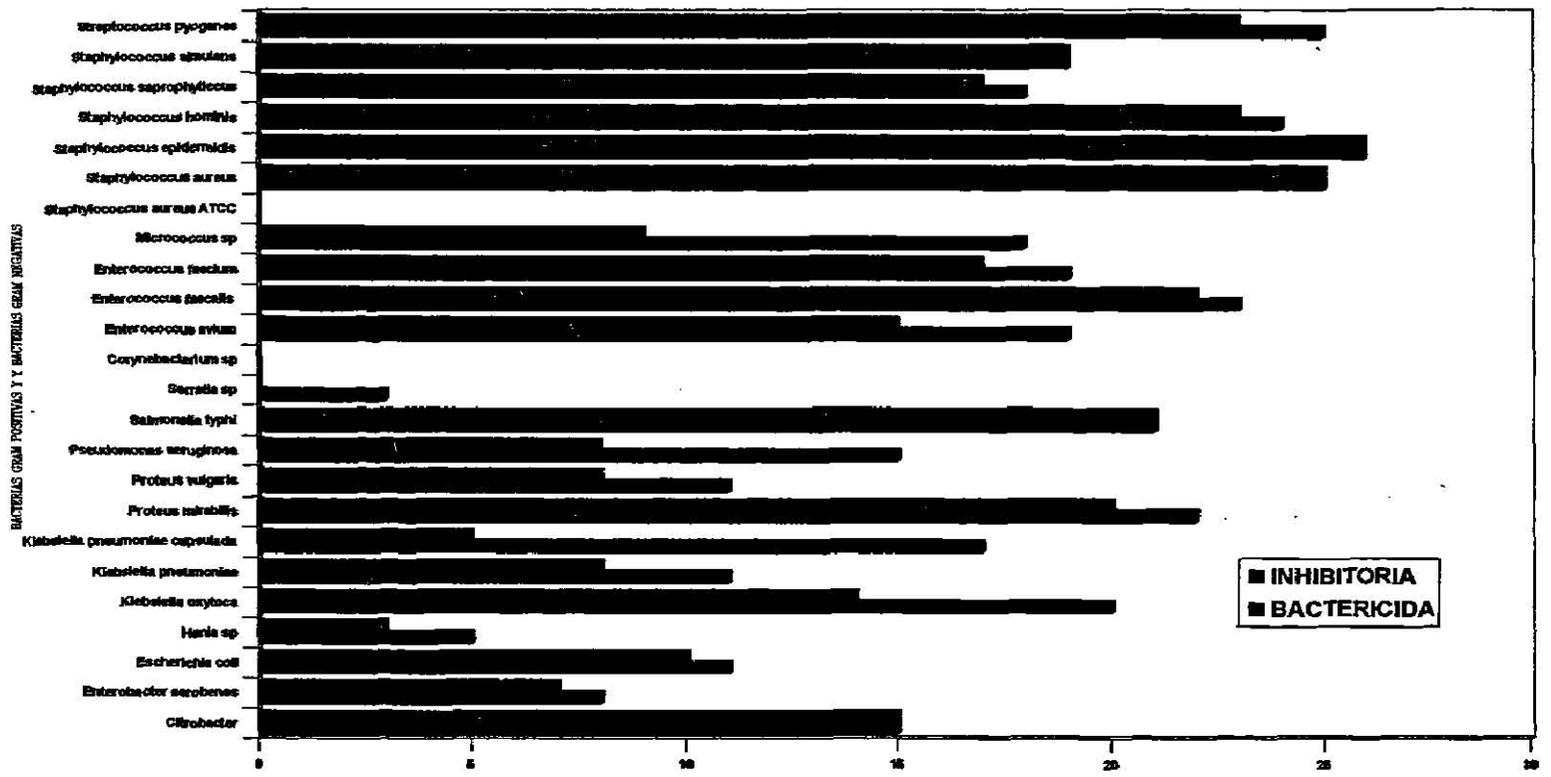
CEFALOTINA mcg/ml			CEFOXITIN mcg/ml				GENTAMICINA mcg/ml			IMIPENEM mcg/ml				CEFOPERAZONE mcg/ml		
2	4	8	16	2	4	8	16	1	2	4	1	2	4	8	4	8
I	B							I-B					I-B			I
								I-B						I		
						I		I-B			I	B				
							I					I	B			
	I			I		B		I-B			I-B				I	
		I-B				I	B									
		I						I		B	I		B			I
	I-B					I-B		I-B						I-B	I-B	
					I	B		I-B								
	I	B				I-B		I	B		I-B				I-B	
														I		
	I-B							I	B		I		B			I
	I-B							I-B			I			B	I	
	I	B						I-B			I	B				I
							I		I		I				I	
-B				I-B				I-B			I-B				I-B	
-B				I-B				I-B			I-B				I-B	
-B				I-B				I-B			I-B				I-B	
	I-B							I-B				I-B				I-B
						I-B		I-B			I-B				I-B	
		I-B			I-B			I-B			I-B				I-B	

NE mcg/ml	TOBRAMICINA mcg/ml			CIPROFLOXACIN mcg/ml				CEFTAZIDIM mcg/ml				AMICACINA mcg/ml				
	16	1	2	4	0.5	1	2	4	2	4	8	16	4	8	16	32
B	I-B				I	B			I-B				I-B			
	I-B				I-B								I-B			
	I-B				I-B				I-B					I	B	
					I-B											
	I-B				I-B				I-B					I-B		
	I	B											I-B			
B					I		B		I							I
	I-B				I-B					I-B			I-B			
	I-B				I-B								I-B			
I-B	I-B					I	B			I	B			I	B	
	I-B				I-B					I-B			I-B			I
						I										
B				I									I	B		I
B	I-B							I-B			I	B	I	B		I
B	I			B				I	I				I		B	I
				I-B		I			I		B			I-B		I
	I-B				I-B								I-B			I
	I-B				I-B				I			B	I-B			I
	I-B				I	B							I-B			I
	I-B												I-B			I
	I-B				I-B				I-B					I-B		I
	I-B				I	B			I-B				I-B			I

32	MEZLOCILINA mcg/ml				CEFOTAXIMA mcg/ml				TICARCILINA/Ac. CLAVULANI			AZTREONAM mcg/ml				CEFTR	
	16	32	64	128	4	8	16	32	16/2	32/2	64/2	2	4	8	16	4	8
					I - B				I - B			I - B				I - B	
					I - B					I - B							
					I - B							I - B				I - B	
					I - B					I	B	I - B				I - B	
					I - B				I		B				I - B	I	
I	I - B				I									I			
	I - B				I - B				I - B			I - B				I - B	
			I			I					I		I				
	I - B				I - B				I - B					I - B		I - B	
	I - B								I - B								
	I - B				I		B		I - B							I - B	
	I - B				I				I - B								
	I - B			B	I	B			I - B			I - B				I - B	
	I - B				I - B				I - B								I -
	I - B				I - B				I - B								I - B
	I - B				I		B		I - B								
	I - B								I - B								
	I	B			I	B			I	B		I - B				I - B	
	I	B			I - B				I - B							I - B	

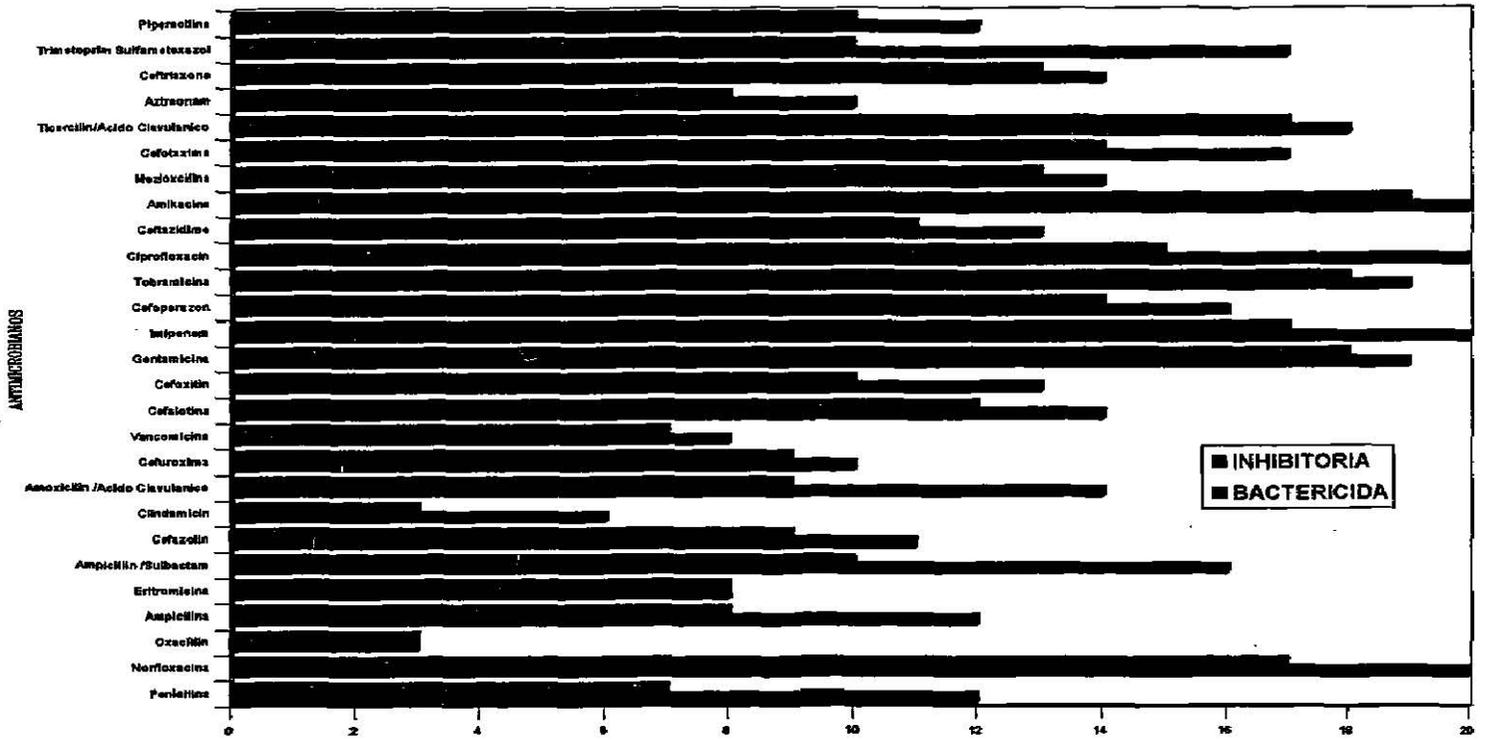
ml	CEFTRIAXOM mcg/ml				TRIMETHOPRIM/SULFAMETHOXAZOL mcg/ml					PIPERACILINA mcg/ml					
	16	4	8	16	32	0.5/9.5	1/19	2/38	4/76	8/152	8	16	32	64	128
		I - B				I - B									
		I - B													
		I - B					I	B		I					
	I - B	I				I - B									
		I - B				I - B					I - B				
					I - B										I
		I - B				I - B					I - B				
						I - B					I	B			
		I - B				I - B					I - B				
		I - B				I - B								I - B	
		I - B								I - B				I	
			I - B			I - B					I - B				
		I - B				I - B					I - B				
				I - B					I - B		I - B				
							I - B				I - B				
		I - B				I - B									
		I - B								I		I	B		

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA GRAFICA 9



RELACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA GRAFICA 10



RELACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE ANTIMICROBIANOS

OBSERVACIONES

En el método con sensidiscos encontramos un alto grado de resistencia a los antimicrobianos ensayados, lo cual es evidente en la tabla no. 1 y la Gráfica no. 1. en las que puede notarse el patrón mayormente resistente de algunas bacterias Gram positivas como el *Staphylococcus simulans* y el *Micrococcus sp* (que raramente produce enfermedad en el hombre) y la ya reconocida multirresistencia del género *Enterococcus*.

Los mismos patrones de resistencia se obtuvieron por el método en placa, con excepción del *Staphylococcus simulans* en el que se encontró sensibilidad intermedia para varios fármacos . Tabla no. 3, Gráfica no. 5.

En la Gráfica no.2, puede observarse en general, la gran resistencia que las bacterias Gram positivas presentan ante algunos antibióticos como la estreptomina (un antibiótico ampliamente usado como antifímico), y la penicilina a la que el género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Enterococcus* son resistentes por la producción de la enzima beta-lactamasa.

La Tabla. no. 2, Gráfica no. 3 muestra en general la gran sensibilidad que las bacterias Gram negativas presentaron ante los fármacos comúnmente usados en infecciones ocasionadas por ellas, encontrándose un completo patrón de sensibilidad ante la cefotaxima (una cefalosporina de tercera generación empleada en infecciones causadas por resistentes a penicilina) y un alto grado de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, el que es muy empleado como antibacteriano de amplio espectro. El patrón de sensibilidad ante los aminoglucósidos como la gentamicina, kanamicina, amikacina, etc. fue muy amplio.

En la Tabla no. 3 y su respectiva Gráfica no. 5 correspondientes al método de sensibilidad de kirby Bauer en placa para bacterias Gram positivas es notable la marcada resistencia a amoxicilina - ác. clavulánico que es un antibiótico de amplio espectro unido a un anillo beta-lactámico distractor de la enzima beta lactamasa. Note la marcada resistencia a oxacilina una penicilina semisintética que se emplea en resistentes a penicilina.

El *Streptococcus pyogenes* exhibe un total patrón de sensibilidad a los antibióticos.

El IMIPENEM un poderoso antibiótico recientemente usado presenta un patrón de sensibilidad total por el método de K.B. en placa Tabla no. 3 y no. 4, Gráfica 6 y 8

La *klebsiella pneumoniae* (capsulada) se muestra ampliamente resistente a los diversos antimicrobianos ensayados. Tabla 4, Gráfica 7.

El trimetoprim - sulfametoxazol por el método de unidiscos mostró gran resistencia que no fue comparable al perfil presentado por el método en placa. Tabla no. 4 Gráfica no.8.

Se realizo un estudio comparativo de los métodos Difusión en agar con unidiscos y el método Kirby Bauer en placa en relación a la respuesta que ambos métodos presentan a los mismos antibióticos a las cepas bacterianas tomándose en cuenta que no se esta utilizando la misma concentración del antibiótico así como tampoco la misma concentración del inculo de la bacteria ya que en el método de unidiscos la concentración de los antibióticos es dada en mg. siendo la concentración del inculo de 1.5×10^8 mcg/ml, en el método de Kirby bauer la concentración de los antibióticos es dada en mcg utilizando una concentración del inculo bacterias de 1×10^6 colonias formadoras de bacterias/ml, lo cual era de esperarse, ya que uno de los métodos incluye la difusión de los antibióticos en un medio de cultivo sólido, en tanto que la otra expone directamente a la bacteria a una concentración baja y una alta de cada uno de los fármacos (Tablas no. 5 y 6).

Encontramos que en la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos usando las dos técnicas, las diferencias se deben a factor humano, debido a que poseen puntos que dependen del observador, por ejemplo ambos métodos se comparan visualmente con el Nefelometro de Mac Farland de 0.5, el cual es un patrón que corresponde a 1.5×10^8 mcg/ml, por el método de Kirby Bauer se realiza una dilución 1:1000 para obtener una concentración de 1×10^6 colonias formadoras de bacterias /ml.

Por el método de difusión en agar con discos se observó que algunas cepas bacterianas presentaron un patrón de heteroresistencia (halo de inhibición y desarrollo dentro del halo) por lo cual fue necesario probar la pureza de la cepa tomándose muestras representativas dentro y fuera del halo de inhibición y posterior inoculación de ambas en agar Mac Conkey, en el que desarrollaron el mismo tipo de colonias, por lo que se procedió a realizar pruebas bioquímicas, comprobando que se trataba de la misma cepa que mostraba heteroresistencia a los antibióticos. Esto puede ser debido a mutación en la cepa, lo que desarrolla resistencia al fármaco, pero que en el momento de su estudio coexisten dos poblaciones, la cepa sensible y la resistente.

la Tabla no 7 se encuentran los datos de la determinación de la CMI y la CMB en donde se puede constatar que estas no siempre coinciden a la misma concentración del antibiótico, y en general puede decirse que la CMI se encuentra en una concentración menor a la CMB.

En la misma tabla se encontró que ningún grupo bacteriano se inhibió a una concentración menor de 1 mcg/ml para la penicilina.

Algunos géneros bacterianos que no habian mostrado sensibilidad por el método K.B. en placa exhibieron una inhibición a la máxima concentración del antibiótico en las placas MIC. Tal es el caso de la Norfloxacin.

El Trimetroprim - Sulfametoxazol funciono como un antibacteriano bactericida, a pesar de que es reconocido como bacteriostático, ver tabla no 7

Para las concentraciones estudiadas de cada antibiótico, se encontraron cepas bacterianas que desarrollaron inhibición para una concentración dada, pero que no presentaron acción bactericida a ninguna concentración incluida en el equipo UNICEP - MIC tipo 3. Observe esto en la Tabla no. 7, concentraciones de 2 y 8 mcg / ml de penicilina para *Klebsiella oxitoca* , *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris* y concentraciones de 1 y 2 mcg / ml de ampicilina para *Klebsiella oxitoca* y *Proteus mirabilis* . etc.

En otros casos la CMI y la CMB coincidieron a la misma concentración por ejemplo en la concentración 0.5 mcg / ml de eritromicina para *Staphylococcus epidermidis* , *Staphylococcus hominis* y *Streptococcus pyogenes*.

DISCUSIÓN

Con el objeto de implementar un método confiable para la determinación de los patrones de sensibilidad - resistencia de diversas cepas bacterianas de importancia médica se probaron dos métodos de Kirby Bauer, por difusión en agar y en placa (método comercial), los cuales se consideraron confiables ya que proporcionaron el patrón de sensibilidad esperado para el *Staphylococcus aureus* ATCC no. 25923. Al inicio del trabajo se montaron por duplicado algunas determinaciones observándose que bajo nuestras condiciones de uso fue más reproducible el método de sensidiscos. Sin embargo debido a que los métodos en placa son caros no se pudo estudiar el total de las cepas por duplicado.

Se esperaba encontrar un patrón de mayor sensibilidad de las bacterias Gram positivas que de las Gram negativas ya que estas últimas poseen una pared más compleja que se cree les proporciona mayor resistencia ante los antibióticos sin embargo en general fueron más resistentes las bacterias Gram positivas. Hacemos notar que las cepas multiresistentes obtenidas cada vez más frecuentemente en área hospitalaria no se incluyeron en este estudio pues las cepas ensayadas serán las empleadas en docencia.

Fue muy notable la marcada resistencia a ciertos antimicrobianos de uso común como el Trimetoprim - sulfametoxazol y la amoxicilina - ácido clavulánico. Estos antimicrobianos se emplean para el tratamiento " en escopetazo", es decir cuando se desconoce la identidad del agente causal de un cuadro infeccioso y se proporciona al paciente un antibiótico de amplio espectro.

Por el método de uso de sensidiscos pueden detectarse cepas heteroresistentes, que no son detectables por el método en placa.

En el método de Kirby Bauer en placa (recientemente comercializado) las concentraciones que se tienen del antibiótico en cada pozo, no siempre igualan las concentraciones requeridas para comparar con el método de difusión con sensidiscos, generalmente las concentraciones que se tienen en la placa son menores a las que se tienen en los sensidiscos, esto ocasiona que en algunos casos no se observa la sensibilidad correspondiente. Sin embargo considerando que esto ya fue tomado en cuenta al estandarizarse el método podemos suponer que es un error despreciable.

Una ventaja del método kirby Bauer en placa comercial es la gran cantidad de antibióticos que pueden ensayarse a la vez. Y una desventaja es el alto costo de los equipos.

CONCLUSIONES

Por el método unidiscos se obtuvo que las bacterias Gram negativas presentan un 62.90% de sensibilidad, 11.29% son intermedios y un 25.80% presentan resistencia.

En este método se observó que el *Citrobacter sp* y el *Proteus mirabilis* presentan respuesta semejante a los antibióticos.

Los *Enterococcus* presentaron un alto índice de resistencia, lo cual se esperaba pues son reconocidos como bacterias multirresistentes.

Los *Staphylococcus* presentan en su mayoría una respuesta de sensibilidad (excepto el *Staphylococcus simulans*); obteniendo un perfil general de las bacterias Gram positivas de un 39.28 % de sensibilidad, 48.80 % de resistencia y 11.90 son intermedios.

En el método de Kirby Bauer se encontró que un 60.71 % son sensibles; 5.80 % son intermedios y un 33.48 % son resistentes para bacterias Gram negativas, para bacterias Gram positivas 63.28 % son sensibles, 10.74 % son intermedios y 21.96 % son resistentes.

En la comparación de ambos métodos se encontró que un 68.5 % mostraba el mismo patrón de sensibilidad y un 31.48 % no mostró el mismo patrón de sensibilidad. Las bacterias Gram negativas mostraron un 75 % el mismo patrón y un 25 % no mostró el mismo patrón de sensibilidad. En el caso de las bacterias Gram positivas 60.41 % mostró el mismo patrón y un 39.58 % no mostró la misma respuesta de sensibilidad.

La CMI y CMB coincidieron en un 63.82 %. Tomándose en donde hubo inhibición como un 100 % la CMI es de un 100 % y la CMB es de 83.77 %

Se estableció el precedente determinando la susceptibilidad a los antimicrobianos de cada una de las cepas conservadas en el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas en la U.A.S.L.P

Para los fines prácticos de empleo en el cepario microbiano de la Facultad de Ciencias Químicas, sugerimos el empleo del método de difusión de los antibióticos en agar y el uso de las placas MIC TIPO 3 para la determinación de la CMI.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BAYLEY SCOTT
FINEGOLD /BARON
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
7a.EDICION
EDICION MEDICA PANAMERICANA
- 2.- BURDON /WILLIAMS
MICROBIOLOGIA
8a. REIMPRESION; 1985
PUBLICACIONES CULTURAL S.A
- 3.-B. D. DAVIS
TRATADOS DE MICROBIOLOGIA
3a. EDICION
SALVAT
- 4.-B. D. DAVIS - R DULBECCO
H. N. EISEN - H.S GINSBERG
TRATADO DE MICROBIOLOGIA
EDITORES SALVAT 1976
- 5.-B. A FREEMAN
MICROBIOLOGIA DE BURROWS
22a.EDICION; 1986
EDITORIAL INTEROAMERICANA
- 6.-ERNEST JAWETZ
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA
7a. EDICION;1992
EDITORAL. EL MANUAL MODERNO

- 7.-KONEMAN ALLEN DOWEL SOMMERS
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
3a. EDICION;1985
EDITORIAL PANAMERICANA
- 8.-LENNETTE / BALOWS / HAUSLER / SHADOMY
MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA
4a. EDICION
EDITORIAL PANAMERICANA
- 9.- MAC FADDIN
PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS
DE IMPORTANCIA CLINICA
EDITORIAL PANAMERICANA 1980
- 10.-P. MURRAY; W DREW; G.KOBAY; J THOMPSON
MICROBIOLOGIA MEDICA
1a. EDICION;1992
EDICION INTERNACIONAL PARA ESTUDIANTES
- 11.-PELCSAR /REID /CHAN
MICROBIOLOGIA
4a. EDICION; 1981
EDITORIAL McGAW - HILL
- 12.- SHOECHTER MOSELIO; GERALD MEDOFF, M. D
BARRY I EISENTEIN, M. D
HUMBERTO GUERRA
2a. EDICION; 1994
EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA
- 13.- UNIDISCOS (BIGAUX)
MORAS 759 COL. DEL VALLE
C.P. 03100 MEXICO D.F.

- 14.-UNISCEPT MIC/TYPE 3
DIVISION OF SHERWOOD MEDICAL
200 EXPRESS STREET
PLAINVIEW, NEW YORK
AÑO 1991
- 15.-UNISCEPT KB/TYPE 3
DIVISION OF SHERWOOD MEDICAL
200 EXPRESS STREET
PLAINVIEW, NEW YORK
AÑO 1991
- 16.- G. VERGER GERAY
ENFERMEDADES INFECCIOSAS
EDITORIAL CIENTIFICA 1988
- 17.-ZINSSER /JOKLIK/ WILLET/ AMOS
MICROBIOLOGIA
18a EDICION
EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA

