

Lej. 33



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

EFFECTO BACTERIOSTATICO Y/O BACTERICIDA  
DE ALGUNAS SALES DE "CLORUROS Y  
SULFATOS" SOBRE Escherichia coli EN RATAS

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A N :

MARIA LUISA ORTIZ ORTIZ

ANTONIO LUNA QUEZADA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.,

1988



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 está 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.

## I N D I C E

	<i>Página</i>
1.0 Introducción.	1
1.1 Acción Antimicrobiana.	2
1.2 Agente Bactericida y Bacteriostático.	2
1.3 Características Generales.	3
1.4 Patogenia.	4
1.5 Fuentes de Infección.	8
2.0 Objetivos.	9
2.1 Planteamiento.	9
2.2 Objetivo.	9
2.3 Hipótesis.	10
3.0 Material y Métodos.	11
4.0 Resultados.	32
5.0 Conclusiones.	54
6.0 Bibliografía.	57

## 1.0 INTRODUCCION

Las sales en bajas concentraciones estimulan el desarrollo de microorganismos, al incrementar sus concentraciones pasan a ejercer un efecto inhibitorio y después un efecto tóxico letal. Un grupo de investigadores encontraron que el cloruro de sodio a bajas concentraciones estimulaba el crecimiento de Escherichia coli, y al aumentar la concentración inhibía su crecimiento. (2, 4).

Hotchkiss (1922), estudió el efecto de diferentes cationes fijando el anión (cloruro) sobre el desarrollo de Escherichia coli, y encontró dos grupos.

El primero tóxico a concentraciones de (0.05M a 2.0M) e incluía a los cloruros de los siguientes Iones: Na, K, Li, NH<sub>4</sub>, Sr, Mg, Ca, Mn, Ti y Sn.

El segundo tóxico a concentraciones del orden de (1X10<sup>-4</sup> a 1X10<sup>-2</sup>) y que involucra a los cloruros de los siguientes Iones: Ni, Ti, Cu, Fe, Zn, Co, Pb, Al, Ce, Cd y Hg.

Se ha observado que los cloruros divalentes y polivalentes son más tóxicos que los monovalentes (1, 3, 11).

### 1.1 ACCION ANTIMICROBIANA

La acción antimicrobiana de los Iones se presenta en tres modalidades distintas y son:

- 1) En concentraciones relativamente grandes (1% ó más) actúan provocando la coagulación de las proteínas.
- 2) Toxicidad provocada por la combinación de ciertos radicales funcionales esenciales de la célula [efecto de quelación].
- 3) Toxicidad debida por alto peso molecular del catión. [2, 5, 11].

### 1.2 AGENTE BACTERICIDA Y BACTERIOESTÁTICO

**Bactericida:** Agente que destruye bacterias.

**Bacterioestático:** Agente que no destruye las bacterias sino que inhibe su proliferación y a largo plazo las destruye. [11, 12].

### 1.3 CARACTERISTICAS GENERALES

Escherichia coli. es una enterobacteria que fue aislada por primera vez por Escherich. en 1885, y en honor a este investigador lleva su nombre. Es flora normal del hombre y los animales, encontrándose en el intestino, algunos serotipos son los causantes más frecuentes de diarreas en los niños, son bacilos gram negativos, pueden ser aerobios y anaerobios o facultativos; su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C, algunas lo hacen mejor a 10°C y otras a 46°C. Algunas cepas producen Hemólisis de los glóbulos rojos debido a que poseen Hemolisinas, fermentan gran variedad de azúcares, producen o no gas, algunas son móviles y otras carecen de flagelos, no producen ácido sulfhídrico.

Escherichia coli. contiene antígenos somáticos "O" de superficie o capsulares "K" y flagelares "H", los antígenos somáticos son termoestables, se conocen más de 150 tipos serológicos diferentes de Escherichia coli.

Los antígenos flagelares "H" y capsulares "K" son termolábiles, se han descrito cerca de 100 serológicamente diferentes. Existen tres tipos diferentes de antígenos "K" que se denominan L, A, B. La mayoría de las cepas enteropatógenas contienen antígenos "K" de la variedad B, los antígenos "H" se encuentran en los flagelos, son termolábiles y se han descrito cerca de 50 tipos serológicamente diferentes.

La mayoría de las cepas de Escherichia coli. forman parte de la flora nor-

mal del intestino y resultan más bien benéficas que perjudiciales, cuando salen del aparato digestivo y se localizan en otros órganos y sistemas, producen cuadros patológicos muy diversos, por ejemplo: *pielonefritis*, *meningitis*, *pneumonías*, *peritonitis*, *contaminación de heridas y septicemias*. (11, 12, 13, 16, - 30, 31).

#### 1.4 PATOGENIA

Phillips. define fisiopatológicamente a la diarrea como un síndrome por mala absorción de agua, causada por bacterias, virus y parásitos cuyos modelos patogénicos son los siguientes: los patógenos bacterianos se pueden dividir en tres grupos de acuerdo a su fisiopatología como son: bacterias enteropatógenas, bacterias enterotoxigénicas y bacterias enteroinvasivas. (28, 29).

##### 1.4.1 BACTERIAS ENTEROPATOGENAS

Determinados serotipos de Escherichia coli. llamados enteropatógenas, participan en el síndrome conocido como diarrea epidémica del recién nacido: por lo general, estos gérmenes no poseen toxinas LT (termolábil) o ST (termoestable) sino son invasores. Su patogenicidad aparentemente depende de otros factores de virulencia, aún no bien establecidos.

Principalmente los serotipos patógenos infectan a los niños menores de seis meses de edad, en particular prematuros y recién nacidos, su papel en las diarreas del niño o del adulto es dudoso, lo que ha dado lugar a controversias acerca de su participación en las gastroenteritis. (26, 32, 33, 34).

Kauffman ha reportado métodos serológicos que permiten desarrollar un esquema taxonómico basado en diferencias antigénicas entre cepas. (11).

El antígeno somático "O" no se inactiva por calentamiento a 121°C. Está compuesto de complejos de fosfolípidos polisacáridos, siendo la naturaleza y el orden de los grupos terminales en el que se presentan en las unidades repetidas de las cadenas de polisacáridos los que confieren especificidad a las numerosas clases de antígenos "O".

Los antígenos "K" son antígenos somáticos que se encuentran como cápsulas o envolturas, cuando se presentan en cantidades suficientes inhiben la aglutinación con antisueros "O". Este efecto inhibitorio, puede ser inactivado por calor.

Los antígenos flagelares "H" son inactivados por calentamiento a 100°C, se encuentran en los flagelos formados por compuestos de flagelina. El contenido y el orden de los aminoácidos en la flagelina determina la especificidad de estos antígenos. (13, 15, 17).



#### 1.4.2 BACTERIAS ENTEROTOXIGENICAS PRODUCTORAS DE EXOTOXINA

En este grupo se encuentran algunas cepas de Escherichia coli. - - - Vibrio cholerae, Shigella A<sub>1</sub>, Aeromonas sp y Plesiomonas sp. En las dos primeras se encuentra toxina termolábil [LT] y termoestable [ST], en cambio en las demás, solamente toxina termolábil. Estas bacterias dan lugar a la diarrea al multiplicarse en la luz del intestino delgado, elaborando una exotoxina que se adhiere a la mucosa intestinal, la que ocasiona un incremento intracelular del AMPc a través de la estimulación de la adenil ciclasa, este fenómeno ocasiona salida de líquidos y electrolitos hacia la luz del tubo digestivo. (17, 31, 32).

La toxina termolábil es inactivada por el calor y los ácidos, constituida por una proteína de alto peso molecular, formadas por dos sub-unidades - "A" (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) y "B", unidas por enlaces no covalentes.

La sub-unidad "A" compuesta por dos cadenas polipeptídicas (alfa y gamma), en donde la cadena alfa es el componente activo de la toxina. La toxina presenta una relación de cinco sub-unidades "B" por cada sub-unidad de "A". Una de las cuales se une a receptores específicos presentes en la membrana de la célula epitelial. En tanto que otra sub-unidad penetra a la misma, desencadenando la actividad enzimática. A la sub-unidad "A" también se le llama colerágeno y la "B" coleragenoide. (21, 22, 31, 32).

La toxina termoestable (ST) es un polipéptido de bajo peso molecular resistente al calor, al ácido y a las enzimas proteolíticas. No se conoce con precisión el mecanismo por el cual la toxina termoestable produce diarrea, - aún cuando es capaz de activar el sistema de la guanilciclase, lo que quizás explique su acción secretora. En esta forma de diarrea no hay invasión de la mucosa, las evacuaciones son líquidas con poco moco y sangre. [31, 32].

#### 1.4.3 BACTERIAS ENTEROINVASIVAS

En este grupo se encuentran Shigella sp., Salmonella sp., algunas cepas de Escherichia coli., Yersinia enterocolitica, Campylobacter sp. y otras. Este grupo de bacterias ocasiona diarreas por invasión de la pared intestinal.

Escherichia coli. enteroinvasiva penetra la mucosa en forma activa, en cambio Salmonella sp. lo hace en forma pasiva, por medio del transporte de polimorfonucleares (PMN) de la luz del intestino hacia la pared. [26].

Escherichia coli. da lugar a la destrucción de la mucosa intestinal a las 72 horas, de la infección se produce edema de la mucosa con poco exudado inflamatorio y aumento de la secreción, con el progreso del padecimiento aparece exudado leucocítico en donde la mucosa y sub-mucosa están infiltradas - por polimorfonucleares (PMN). Por lo tanto las manifestaciones clínicas son

fiebre y malestar general, aunado a evacuaciones con moco y sangre. [11, 33].

### 1.5 FUENTES DE INFECCIÓN

Las cepas de Escherichia coli. encuentran su habitat en el tracto gastrointestinal, siendo las evacuaciones la fuente de contagio primaria, el inadecuado manejo de los alimentos, la falta de higiene y malas condiciones sanitarias, han dado lugar a las infecciones en niños recién nacidos, por lo tanto es de gran importancia controlar todos estos factores. [11, 12, 14].

En el caso de bacterias enterotoxigénicas y enteroinvasivas es necesario ingerir grandes inóculos para que el padecimiento se desarrolle; lo que requiere multiplicación previa de la bacteria en los alimentos o la contaminación masiva de los alimentos con materia fecal. [11, 28].

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 PLANTEAMIENTO

Las enfermedades diarreicas agrupan una serie de padecimientos de muy diversa índole, siendo la etiología infecciosa la más importante por su carácter contagioso de las principales causas de muerte entre los niños menores de cinco años de edad. Por tal motivo, se propone un estudio de los patógenos - [Escherichia coli.] enterotoxigénicas y enteroinvasivas, tratadas con diversas sales en forma de iones para formular medidas preventivas y de tratamiento. Y de esta manera demostrar las propiedades bactericidas o bacteriostáticas de cloruros y sulfatos.

### 2.2 OBJETIVOS

a) Determinar si existen sales de cloruros y sulfatos que funcionen como bactericidas y/o bacteriostáticos contra Escherichia coli.

b) Corroborar si las sales de cloruros y/o sulfatos tienen un efecto bactericida *in vitro*.

c) Obtener la  $DL_{50}$  para las sales que funcionen como bactericidas administradas por vía oral, en un modelo de rata macho de 3 a 6 meses de edad.

d) Determinar el estado de salud de las ratas inoculadas con Escherichia coli. y su sal correspondiente mediante una biometría hemática completa y su sintomatología clínica.

### 2.3 HIPOTESIS

a) Las sales de cloruros y sulfatos preparadas a una dosis conocida no tóxica para el animal, pueden funcionar como bactericidas y/o bacteriostáticos contra la Escherichia coli.

b) Si administramos las sales por vía oral, su efecto será bacteriostático y/o bactericida al mismo tiempo será menos tóxico para el animal, corroborándose con una biometría hemática completa y el cuadro clínico presente en el animal de experimentación.

### 3.0 MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 MATERIAL Y EQUIPO

##### Material

- 150 ratas macho 3-6 meses de edad, cepa CIIZV cepa Zaragoza, que proviene de la cruce de ratas, cepa Long Evans y cepa de ratas Wistar.
- Cepa de Escherichia coli. enteroinvasiva O<sub>55</sub>, B<sub>5</sub> (LT) Escherichia coli. enterotoxigénica O<sub>111</sub>, B<sub>3</sub> (LT), Escherichia coli. flora normal. Proporcionadas por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Nutrición.
- Antisueros para la tipificación de enterobacterias (DIFCO) para Escherichia coli. enteropatógena poly A. (O<sub>26</sub>; K<sub>60</sub>, O<sub>55</sub>; K<sub>59</sub>, O<sub>111</sub>; 58, O<sub>27</sub>; K<sub>63</sub>).  
Suero Anti-coli Polivalente I, II, BEHRING.
- Medios de cultivo (MERCK, BIOXON).

	<u>pH</u>	<u>Marca</u>	<u>Cantidad</u>
- Base de Agar EMB.	7.2	BIOXON	1000 ml
- Base de Agar nutritivo	6.8	BIOXON	1000 ml
- Agar SIM	7.3	BIOXON	200 ml

	<u>pH</u>	<u>Marca</u>	<u>Cantidad</u>
- Agar Citrato de Simmons.	6.9	MERCK	300 ml
- Medio de Voges-Proskauer.	6.9	BIOXON	300 ml
- Caldo lactosa.	6.9	MERCK	300 ml
- Caldo manitol.	7.4	BIOXON	300 ml
- Gradilla.			
- Aceite inmersión ZEISS.			
- Cámara de Neubauer.			
- Cubre hematómetro.			
- Pipeta para cuenta de leucocitos.		PROPER TROPHY	
- Pipeta SAHLI.			<u>Capacidad</u> 0.02 ml
- Porta objetos.		INTRAMEDIC, S.A.	25 X 75 mm

- Cubre objetos. MADESA 22 X 22 mm
- Vernier. BACO
- Pipetas (1, 5, 10 ml) PYREX.
- Vasos precipitados 100 ml. PYREX.
- Tubos de ensayo 13 X 100 KIMAX.
- Cajas petri 100 X 100 PYREX.
- Multidiscos Bioclín combinados. (Gram positivo y Gram negativo).

Reactivos (MERCK, BAKER)

- Eter etílico anhidro. Grado Analítico.
- Cloruro de Magnesio. Grado Reactivo.
- Cloruro de Potasio. Grado Reactivo.
- Cloruro de Sodio. Grado Reactivo.



- Cloruro de Calcio. Grado Reactivo.
- Sulfato de Sodio. Grado Reactivo.
- Sulfato de Magnesio. Grado Reactivo.
- Cloruro de Bario. Grado Reactivo.
- Acido Sulfúrico al 1%.
- Solución salina 0.85% Marca TRAVENOL.
- Reactivo de Kovacs.
- Reactivo de Voges-Proskauer.
- E.D.T.A. al 10%.
- Reactivo de Drabkin.
- Reactivo de Turk.
- Colorante de Wright.

- Reactivo de Gram (cristal violeta, lugol, safranina, alcohol, acetona).

### Soluciones Usadas

- Serie de Tubos de Mc. Farland. (Nefelómetro de Mc. Farland). (31, 32).
- Cloruro de Bario al 1%.
- Acido Sulfúrico al 1%.
- Cloruro de Magnesio 0.5, 1.0 M.
- Cloruro de Potasio 1.0, 1.5, 2.0 M.
- Cloruro de Sodio 1.0, 1.5, 2.0 M.
- Cloruro de Calcio 1.0, 1.5, 2.0 M.
- Sulfato de Sodio 0.25, 0.5, 1.4 M
- Sulfato de Magnesio 0.25, 0.5, 2.0 M.
- Líquido de Turk  
ácido acético glacial 3.0 ml  
Agua destilada c.b.p. 100.0 ml  
Adicionar 1 ó 2 gotas de azul de metileno. (12, 32).

- Colorante Wright.

Bicarbonato de sodio al 0.5% 100.0 ml.

Azul de metileno 1.0 g

Calentar a 100°C durante una hora, enfriar y filtrar para eliminar el precipitado.

De la mezcla anterior 100.0 ml.

Solución acuosa de EOSINA al 0.1% 500.0 ml.

Se obtiene abundante precipitado se toma 0.1g y se le añade 60 ml. de metanol dejándose añejar unos 5 días a 35<sup>±</sup> 2°C. (30).

- Solución Amortiguadora de Fosfatos.

Fosfato de potasio monobásico anhidro 6.63 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro 2.56 g

Agua destilada c.b.p. 100.0 ml

pH= 6.4

(30).

Equipo

- Espectrofotómetro espectral 20.

Bausch & Lomb.

- Estufa Riessa Modelo EC.

- Estufa MAPSA Modelo HDP-334

- Balanza granataria OHAUS.
- Balanza analítica METTLER H80.
- Olla esterilizadora (express) PRESTO Modelo S-12 L.
- Mezclador SOLBAT.
- Vortex Genie Modelo K550 G
- Refrigerador PHILIPS Modelo 4107.
- Congelador AMERICAN Modelo CV250.
- Microscopio ZEISS.
- Mechero de gas FISHER.
- Termómetro -10°C - 200°C TAYLOR

### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS [32]

Se usan multidiscos Bioclín combinados.

Una caja con medio de agar nutritivo lista para usarse.

Se siembra masivamente con cepa de Escherichia coli. enterotoxigénica, enteroinvasiva y flora normal cerca de la flama de un mechero, posteriormente con unas pinzas estériles se toma una tira de multidiscos Bioclín combinados y se coloca sobre la cepa sembrada, dejándose incubar a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . por 24 horas.

La sensibilidad se observa por inhibición del desarrollo de las colonias (halo de inhibición). (2).

#### 3.2.2 COLECTA DE CEPAS DE Escherichia coli. --- ENTEROTOXIGENICA Y ENTEROINVASIVA [11, 16]

Las cepas de Escherichia coli. enterotoxigénica, enteroinvasiva y flora normal, se siembran en varios medios de agar nutritivo por 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  y después con isopos estériles se colectan en tubos conteniendo solución salina al 0.85% y se guardan en el congelador, posterior a su descongelación.

miento para su uso se le hacen sus pruebas de viabilidad; que consiste en ver que produzca crecimiento y que sus características morfológicas, coloniales y bioquímicas, coincida con las cepas de antes de su congelamiento.

### 3.2.3 PREPARACION DE SENSIDISCOS IMPREGNADOS CON CADA SOLUCION PROBADA (1).

Depositar discos de papel filtro en cada solución concentrada y sus respectivas diluciones por un tiempo de 15 minutos, posteriormente colocar los discos en tubos de ensayo secos y respectivamente etiquetados, secándolos en la estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por un tiempo de 24 horas, ya secos están listos para usarse.

#### Soluciones Probadas:

- Cloruro de Magnesio 0.5, 1.0 M.
- Cloruro de Potasio 1.0, 1.5, 2.0 M.
- Cloruro de Sodio 1.0, 1.5, 2.0 M.
- Cloruro de Calcio 1.0, 1.5, 2.0 M.
- Sulfato de Calcio 0.25, 0.5, 2.0 M.
- Sulfato de Magnesio 0.25, 0.5, 2.0 M.

3.2.4 ENSAYOS DEL PODER BACTERICIDA Y/O  
BACTERIOSTÁTICO DE LAS SALES CONTRA  
LAS DIVERSAS CEPAS DE - - -  
Escherichia coli. IN VITRO (3)

Medios de agar EMB y nutritivos se siembran masivamente con cepa de - -  
Escherichia coli, enterotoxigénica, enteroinvasiva y flora normal con isopo  
estéril, posteriormente con pinzas estériles se procede a colocar sobre la  
superficie sembrada los discos impregnados con cada una de las soluciones y  
sus respectivas diluciones.

Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Se trabaja cerca de un mechero, se usa un medio de agar EMB para cada sal  
y sus diluciones.

Transcurrido el tiempo de incubación observar si hubo inhibición del cre  
cimiento bacteriano, se procede a medir el halo de inhibición con un vernier.

3.2.5 OBSTENCION DE LA DL<sub>50</sub> Y DE<sub>50</sub> PARA LAS  
DIVERSAS SALES POR EL METODO DE PRO-  
TECCION DE REED Y MUENCH (34)

Formar tres lotes, cada lote con una cantidad de seis ratas macho 3-6 meses de edad cepa C112V proveniente de la cruce de ratas cepa Long Evans y cepa de ratas Wistar.

A cada lote de ratas inocular por vía oral la sal, se preparan tres concentraciones diferentes de la sal en solución y se inocula a cada lote una concentración diferente única, (g/ml). De los resultados graficar efecto contra la concentración y calcular DL<sub>50</sub> por el Método de Protección de Reed y Muench.

- a) 4.0 g/Kg - 1.2 g/ml
- b) 2.0 g/Kg - 0.6 g/ml
- c) 1.0 g/Kg - 0.3 g/ml

3.2.6 FORMA DE INOCULAR POR VIA ORAL

Con la mano izquierda tomar la rata de la siguiente manera: De forma que no se asuste, ni se lastime colocar la cabeza entre los dedos medio e índice y levantar la mano estirando suavemente de modo que su cuerpo quede soportado sobre la mano y la cola enrollada sobre el dedo meñique. Efectuada esta operación introducir la jeringa con la sonda hasta que penetre la mayor parte posi-



ble al esófago e introducir las soluciones, (para mayor protección se puede - utilizar un guante de piel).

### 3.2.7 OBTENCIÓN DE LA $DL_{50}$ PARA *Escherichia coli*.

#### IN VIVO EN RATAS POR EL MÉTODO DE PROTECCIÓN DE REED Y MUENCH (7, 31, 34)

Preparar una serie de tubos de Mc. Farland [Nefelómetro], que consta de una mezcla de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1%. Cada tubo corresponde a una cantidad de millones de bacterias por ml.

<u>Tubo</u>	<u>Cloruro Bario al 1% ml</u>	<u>Acido Sulfúrico al 1% ml</u>	<u>Bacterias en Millones por ml</u>
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

11

1.- Hacer una suspensión de 10 bacterias de *Escherichia coli*./ml ajustadas por nefelometría.

2.- Tomar 5 lotes de 6 ratas e inocularlas por v/a intravenosa con 1 ml de la suspensión anterior procediendo de la siguiente manera:

<u>L o t e</u>	<u>D i l u c i ó n</u>
1	original
2	1:10
3	1:100
4	1:1000
5	1:10000

3.- Calcular la proporción de la mortalidad para cada lote.

4.- Observar la dosis entre las cuales se encuentran aquellas que mata al 50% de los individuos.

5.- La  $DL_{50}$  se calcula mediante el siguiente procedimiento:

$$DP = \frac{X - 50}{X - Y}$$

DP: Distancia proporcional entre la dilución inmediata superior e inmediata inferior a la que mata al 50% de los individuos.

X: Mortalidad por ciento de la dilución inmediata superior a la que mata al 50% de los animales.

Y: Mortalidad por ciento en la dilución inmediata inferior a la que mata al 50% de los animales.

$$\log DL_{50} = A - (DP \times B)$$

A: Log negativo de la dilución inmediata superior a la que mata al 50% de los animales.

B: Log del factor de dilución

Inocular por vía intravenosa a cada lote de ratas, una concentración diferente de bacterias de Escherichia coli. por mililitro. Observar el efecto que se produce en cada lote de ratas, asimismo graficar efecto contra concentración y calcular la  $DL_{50}$  por el Método de Reed y Muench (34).

La inoculación por vía intravenosa se produce de la siguiente manera:

Colocar la rata dentro de un frasco amplio que contenga algodones humedecidos con éter, después de 2-3 minutos observar si la rata ya presenta síntomas de anestesia, si presenta este efecto sacarla del frasco y colocarla sobre una tabla de disección en posición de frente. Localizar el pene y extraerlo, observando donde se encuentra la vena caudal, con extremo cuidado introducir la jeringa para insulina (1 ml) e inyectar la suspensión bacteriana y colocar las ratas dentro de una jaula para su recuperación.

### 3.2.8 EFFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTATICO

De las diversas sales sobre Cepas de Escherichia coli. (enteroinvasivas, enterotoxigénicas y flora normal). *in vivo*. Formar 8 grupos de ratas, cada grupo integrado con 10 ratas macho 3-6 meses de edad Cepa CIIV.

Grupo 1: Grupo control (se les aplica solución salina al 0.85% por vía oral).

Grupo 2: Inocular por vía oral la sal a una concentración no letal para el animal.  $DL_{50}$  Ca  $cl_2$  4g/Kg peso.

Grupo 3: Inocular por vía intravenosa (vena caudad-pene). Cepa de - - Escherichia coli. enterotoxigénica a una concentración no letal para el animal.

Grupo 4: Inocular por vía intravenosa (vena caudal-pene). Cepa de - - Escherichia coli. enteroinvasiva a una concentración no letal para el animal.

Grupo 8: Inocular por vía intravenosa (vena caudal-pene). Cepa de - - Escherichia coli. Flora normal a una concentración no letal para el animal.

NOTA: Los grupos 1, 2, 3, 4 y 8 de ratas se sacrifican para hacer Biometrias Hemáticas completas al tercer día de inoculadas.

Las concentraciones usadas de las sales químicas y Cepas bacterianas son calculadas por el Método de Reed y Muench.

Grupo 5: Inocular por vía intravenosa (vena caudal-pene). Cepa de --  
Escherichia coli. Flora normal y la sal por vía oral.

Grupo 6: Inocular por vía intravenosa (vena caudal-pene). Cepa de --  
Escherichia coli. enteroinvasiva y la sal por vía oral.

Grupo 7: Inocular por vía intravenosa (vena caudal-pene). Cepa de --  
Escherichia coli. enterotoxigénica y la sal por vía oral.

NOTA: Los grupos 5, 6 y 7 se inoculan con las cepas de Escherichia coli. por vía intravenosa (vena caudal-pene) y al segundo día administrar la sal por vía oral, finalmente al tercer día se procede a obtener las Biometrías Hemáticas completas. Asimismo, observar como es modificado el estado de salud de las ratas y comparar los resultados entre los diferentes grupos de ratas.

### 3.2.9 FORMA DE INOCULAR POR VIA. INTRAVENOSA (vena caudal-pene)

- Colocar la rata dentro de un frasco amplio que contenga algodones humedecidos con éter, después de 2-3 minutos observar si la rata ya presenta síntomas de anestesia, si presenta este efecto sacarla del frasco y colocarla sobre una tabla de disección en posición de frente. Localizar el pene y extraerlo, observando donde se encuentra la vena caudal, con extremo cuidado introducir la jeringa para insulina (1 ml) e inyectar la suspensión bacteriana y colocar las ratas dentro de una jaula para su recuperación.

### 3.2.10 REALIZACIÓN DE BIOMETRIAS HEMATICAS [12]

Colocar la rata dentro de un frasco que contenga algodones impregnados con Eter, después de 2 minutos notar si la rata presenta los signos de la anestesia, en caso positivo, sacarla del frasco y colocarla de frente sobre una tabla de disección, inmediatamente tomar el bisturí y hacer la disección en la pata delantera derecha a la altura axilar, hasta localizar la vena axial, la sangre se toma directamente en un tubo de ensayo que contiene 0.07 ml de EDTA al 10% (cantidad para 5 ml de sangre), mezclar perfectamente de manera que la sangre no se hemolice y coagule.

Las ratas desangradadas se descerebran finalmente, para evitar causarle mayor dolor.

A las muestras de sangre se les determina hemoglobina, hematocrito, cuenta de leucocitos y diferencial.

### 3.2.11 DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA [12, 32]

- a) Colocar en un tubo de ensayo de 13 X 100 mm 5 ml de reactivo de Drabkin (líquido diluyente).
- b) Homogenizar perfectamente bien la sangre.

- c) Llenar con sangre la pipeta de Sahli hasta la marca, calibrada a 0.02 ml, limpie la sangre adherida al exterior de la pipeta y transfiera el contenido en la solución de Drabkin, enjuagando 3 veces la pipeta.
- d) Mezclar la sangre con el diluyente mediante la rotación del tubo.
- e) Dejar en reposo durante 10 minutos para la formación de la cianometahemoglobina.
- f) Leer en el espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco de reactivo - (de Drabkin).
- $$\text{Abs} \times 36.8 \text{ g/dl} = \text{Hb g/dl} \quad (12)$$

Reactivo de Drabkin

Ferricianuro de Potasio	200 mg
Cianuro de Potasio	50 mg
Bicarbonato de Sodio	1 mg
Agua destilada	1000 ml

[Guardarse en frasco ámbar, temperatura ambiente] (30, 32).

### 3.2.12 DETERMINACIÓN DE HEMATOCRITO

#### (MICRO HEMATOCRITO) [32]

- a) Llenarse con sangre venosa (EDTA) las 2/3 partes de un tubo capilar.
- b) El tubo capilar se cierra a la flama o se sella con plastilina, por el extremo más distante de la sangre con objeto de no hemolizarla, efectuando un movimiento de rotación.
- c) Una vez que está perfectamente sellado se lleva a una centrífuga especial (cabezal ranurado para colocar los capilares) y se centrifuga a 3500 R.P.M. durante 5 minutos.
- d) Calcular el porcentaje del paquete eritrocítico con relación al volumen total. [12].

### 3.2.13 CUENTA DE LEUCOCITOS [32]

- a) Llenar la pipeta de Thoma para glóbulos blancos, con sangre bien mezclada hasta la marca de 0.5.
- b) Limpiar cuidadosamente la pipeta por fuera.
- c) Aforar con solución de Turk hasta la marca de 11.
- d) Agitar la pipeta durante tres minutos.



- e) Se desechan las primeras 4-5 gotas de la pipeta y se carga la cámara de Neubauer.
- f) Dejar reposar la cámara durante tres minutos.
- g) Con el objetivo de 10X del microscopio, se cuentan los leucocitos presentes en los cuatro cuadros grandes (1 mm de lado) de los extremos de la cámara de Neubauer.
- h) Multiplicar por 50 el número de leucocitos contados para obtener la cifra de leucocitos/mm<sup>3</sup> de sangre, como se explica a continuación:

Cálculo: Si llamamos B al número de leucocitos en cuatro cuadros grandes, existen "B" glóbulos blancos en  $4 \times 1 \times 0.1 = 0.4 \text{ mm}^3$   
 o sea  $\frac{B \times 10}{4}$  glóbulos blancos ocupan  $1 \text{ mm}^3$

Pero como la sangre está diluida 20 veces:

$$\begin{aligned} \text{número de glóbulos blancos en } 1 \text{ mm}^3 \text{ de sangre} &= \frac{B \times 10 \times 20}{4} \\ &= \underline{\underline{50 B}} \quad (12, 30, 32) \end{aligned}$$

3.2.14 PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR UNA EXTENSION  
Y TINCIÓN DE WRIGHT.

- a) Coloque una pequeña gota de sangre (EDTA 10%) en un extremo de un porta objetos, limpio y desengrasado. Utilizando el borde de otro porta objetos, extienda la gota de sangre a lo largo del porta objetos con un movimiento uniforme, con un ángulo de  $45^\circ$ .
- b) Secar al aire.
- c) Colocar la preparación en posición horizontal y cubrirlo con colorante de Wright  $\text{ph} = 6.4$  por dos minutos. Se agrega lentamente la solución amortiguadora ( $\text{ph} = 6.4$ ) sobre el colorante, hasta la aparición de un brillo metálico en la superficie.
- d) Después de cinco minutos se lava el porta objetos con agua y se seca al aire.
- e) El examen microscópico morfológico de las extensiones debe limitarse a la porción delgada de la extensión, donde los eritrocitos están en contacto pero no sobrepuestos (12, 30, 32)

#### 4.0 RESULTADOS

Se obtuvieron los siguientes resultados de sensibilidad a los antimicrobianos, midiendo la sensibilidad mediante los halos de inhibición (en diámetros, en centímetros), tomando en cuenta los antibióticos con mayor efecto.

---

	<u>Escherichia coli.</u> Flora Normal	<u>Escherichia coli.</u> Enterotoxigénica	<u>Escherichia coli.</u> Enteroinvasiva
Acido Nalidixico	0.7 cm	0.8 cm	0.7 cm
Cefotaximr	0.8 cm	0.7 cm	0.7 cm
Cloranfenicol	-	0.6 cm	0.6 cm
Gentamicina	0.3 cm	0.4 cm	0.3 cm
Furadantina	0.3 cm	0.3 cm	0.3 cm

---

Como se observa, las diferentes cepas de Escherichia coli. presentan la misma sensibilidad a los antibióticos, y la finalidad de su uso es para determinar la patogenicidad de las cepas, es decir para comprobar que no han variado o sea que no se han hecho más resistentes o sensibles a dichos antibióticos y tener la certeza que la cepa bacteriana tiene las mismas propiedades biológicas a todo lo largo de la experimentación con los animales de laboratorio.

Nota: Se repitió (6 veces) a lo largo del trabajo experimental y siempre dieron el mismo resultado las cepas bacteriológicas usadas.

RESULTADOS ENCONTRADOS DEL PODER BACTERICIDA Y/O  
BACTERIOSTÁTICO DE LAS DIVERSAS SALES QUÍMICAS -  
PRÓBADAS EN VITRO.

El poder bactericida es medido por inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas, formándose halos de inhibición (cm). De las siguientes sales químicas probadas in vitro, solo una sal demostró tener poder bacteriostático en las diversas Cepas de Escherichia coli. ensayadas.

- 1) Cloruro de Magnesio.
- 2) Cloruro de Potasio.
- 3) Cloruro de Sodio.
- 4) Cloruro de Calcio.
- 5) Sulfato de Calcio.
- 6) Sulfato de Magnesio.

El cloruro de Calcio es la única sal química que funciona como agente bacteriostático.

	<u>Escherichia coli.</u> Flora Normal	<u>Escherichia coli.</u> Enterotoxigénica	<u>Escherichia coli.</u> Enteroinvasiva
Cloruro de Calcio 1.5 Molar (M)	0.4 cm	0.4 cm	0.3 cm.
Cloruro de Calcio dilución 1:5 de la arriba mencionada .	0.1 cm	0.2 cm	0.1 cm

El Cloruro de Calcio tiene un poder bacteriostático *in vitro*, porque solo inhibe el crecimiento bacteriano, ya que se demostró que retirando los sensibilizadores impregnados con solución de Cloruro de Calcio de los medios de cultivo, sembrados con las diversas Cepas de *Escherichia coli.* a 37°C, las Cepas Bacterianas crecían normalmente después de haber sido inhibidas temporalmente. Comparando los halos de inhibición del Cloruro de Calcio con los antibióticos del antibiograma se observa que presentan un efecto inhibitorio similar a la furadantina y gentamicina.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA DL<sub>50</sub> Y DE<sub>50</sub> PARA LAS  
SALES QUÍMICAS POR EL METODO DE REED Y MUENCH

De los ensayos realizados *in vitro* del poder bactericida y/o bacterios-tático de las distintas sales químicas contra Escherichia coli. Solo funcio-nó el cloruro de calcio (2M). Ca cl<sub>2</sub> por lo que se procedió a calcular la DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub> para el cloruro de calcio. Se encontró una DL<sub>50</sub> para el clo-ruro de calcio de 0.71 g/ml (2377.13 mg/Kg), esta dosis nos indica que con una cantidad, por debajo de la DL<sub>50</sub> de cloruro de calcio, podemos adminis-trar la sal sin riesgo de que las ratas sean afectadas por la sal, ya que - lo que se busca es que el cloruro de calcio (oral) contrareste la patogeni-cidad causada por las bacterias de Escherichia coli. *in vivo*.

<u>LOTE (RATAS)</u>	<u>CONCENTRACION</u>	<u>EFFECTO (MUERTE)</u>	<u>% RESPUESTA</u>	<u>DILUCION</u>
1	1.2 g/ml---4000 mg/Kg	6/6	100	
2	0.6 g/ml---2000 mg/Kg	4/6	66.6	1:2
3	0.3 g/ml---1000 mg/Kg	0/6	0	1:4

$$DP = \frac{X-50}{X-Y} = \frac{66.6 - 50}{66.6 - 0} = \frac{16.6}{66.6} = \underline{0.2492493}$$

$$A = \text{Log } 2000 \text{ mg/Kg} = 3.30103$$

$$B = \text{Log } 0.5 = -0.30103$$

$$\text{Log } DL_{50} = A - (DP \times B)$$

$$\text{Log } DL_{50} = 3.30103 - (0.24924 \times -0.30103) = 3.3760615$$

$$DL_{50} = 10^{3.376065}$$

$$DL_{50} = 2377.17 \text{ mg/Kg} = 0.713 \text{ g/mL}$$

Cálculo de DE<sub>50</sub>

$$A = \text{Log } 1000 \text{ mg/Kg} = 3.0$$

$$B = \text{Log } 0.25 = 0.60206$$

$$DP = 0.2492493$$

$$\text{Log } DE_{50} = 3.150063$$

$$DE_{50} = 10^{3.150063}$$

$$DE_{50} = 1412.7 \text{ mg/Kg} = 0.423 \text{ g/mL}$$

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS DE LA DL<sub>50</sub>  
PARA LAS DIVERSAS CEPAS DE Escherichia coli.

La DL<sub>50</sub> para las diversas Cepas de Escherichia coli. (flora normal, - Enterotoxigénica y Enteroinvasiva) no se pudo obtener, ya que las ratas respondieron de manera irregular. Estos efectos quizás se deban a la variabilidad biológica de los animales. Una serie de circunstancias fisiológicas - pueden modificar notablemente la respuesta a los fármacos motivando resultados muy distintos y son:

Especie: las diferencias metabólicas en una u otra especie animal pueden condicionar una gran variabilidad de respuestas, la distribución de sistemas enzimáticos en las distintas especies es sorprendentemente variada y es una cuestión fortuita descubrir la eventual eficacia medicamentosa de un nuevo compuesto, basándose en la experimentación animal.

Raza: En ocasiones existen también grandes diferencias metabólicas entre las cepas o las razas que constituyen una misma especie.

Sexo: Existen diferencias de metabolización de determinados fármacos - en los dos sexos, de manera inespecífica se señala que la presencia de una mayor proporción de tejido adiposo -menos activo metabólicamente- en la mujer, es lo que determina que, en general, la dosis de un medicamento activo deba ser reducido en un 25% en relación con lo que se administraría a un varón en iguales circunstancias.



### *Edad y Alimentación.*

La variabilidad biológica se debe a que los efectos de los medicamentos no son idénticos en todos los organismos e incluso en un mismo organismo en diversas ocasiones. La acción y posteriormente el efecto de un fármaco es el resultado final de un largo proceso en el cual se involucra una gran cantidad de factores como son:

*Edad:* La respuesta a los fármacos está en función de la edad. Bien conocida es la distinta sensibilidad de los recién nacidos y lactantes a diversos medicamentos, con respecto al adulto, debido especialmente a la falta de madurez de determinadas estructuras o sistemas enzimáticos.

*Peso:* El mayor o menor peso de un individuo es determinante para que la droga alcance la concentración necesaria en el lugar donde va a actuar, dependiendo de la liposolubilidad del medicamento.

*Sexo:* Las diferencias sexuales en la acción de los medicamentos dependen de la capacidad de los sistemas enzimáticos encargados de su metabolismo. Así como las diferencias hormonales entre los dos sexos.

*Factores Genéticos:* Se conocen actualmente gran número de drogas cuya acción en el hombre es influida por mecanismos fisiológicos determinados genéticamente.

*Factores Fisiológicos:* Los factores fisiológicos que influyen en la acción de los fármacos dependen de las características genéticas. La dieta puede ser causa de variaciones en la sensibilidad a los medicamentos.

*Factores Patológicos:* La variación de la acción de los fármacos puede también deberse a la presencia de determinados trastornos patológicos. Las alteraciones patológicas hepáticas en el animal de experimentación pueden alterar el metabolismo de los medicamentos y por tanto, su actividad.

*Circunstancias Ambientales:* En determinados casos el medio ambiente que rodea al individuo sujeto a la acción de una droga puede influir sobre el efecto de la misma (clima, altitud, estación, temperatura y la hora del día pueden influir en la acción de un fármaco). (33, 34, 35)

RESULTADOS DEL EFECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOESTÁTICO  
DE LAS SALES QUÍMICAS IN VIVO

Basándose en el análisis de una biometría hemática completa para las ratas, se obtuvieron los siguientes resultados, donde se agruparon lotes de ratas de la siguiente forma:

- Grupo I: Ratas testigo inoculadas por vía oral con solución salina al 0.85 % estéril.
- Grupo II: Ratas inoculadas con cloruro de calcio por vía oral al 0.5 g/ml
- Grupo III: Ratas tratadas con Escherichia coli. enterotoxigénica por vía intravenosa (vena caudal-pene).
- Grupo IV: Ratas tratadas con Escherichia coli. enteroinvasiva por vía intravenosa (vena caudal-pene).

- Grupo V: Ratas inoculadas con Escherichia coli. flora normal por vía intravenosa (vena caudal-pene) y cloruro de calcio 0.5 g/ml por vía oral.
- Grupo VI: Ratas tratadas con Escherichia coli. enteroinvasiva por vía intravenosa (vena caudal-pene) y cloruro de calcio 0.5 g/ml por vía oral.
- Grupo VII: Ratas inoculadas con Escherichia coli. enterotoxigénica por vía intravenosa (vena caudal-pene) y cloruro de calcio 0.5 g/ml por vía oral.
- Grupo VIII: Ratas inoculadas con Escherichia coli. flora normal por vía intravenosa (vena caudal-pene).

RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA GRUPO

Grupo I. Ratas inoculadas con solución salina al 0.85% vía oral

---

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
1	8.46	24	5050	78	0	25	22
2	9.20	24	5650	85	0	15	15
3	9.09	23	5600	89	0	11	11
4	8.56	24	6100	72	0	28	28
5	9.81	24	5400	83	0	17	17

---

En este grupo las ratas se mantuvieron en estado normal sin alteración aparente.

Grupo II. Ratas inoculadas vía oral con solución de cloruro de calcio 0.5 g/ml

---

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
6	13.24	52	10000	85	1	14	14
7	13.61	51	9850	92	0	8	8
8	12.88	52	5300	93	0	7	7
9	12.78	53	6850	90	0	10	10
10	12.14	49	7250	85	0	15	15
11	13.52	50	7550	91	0	9	9
12	13.15	51	8320	94	0	6	6
13	12.45	50	9700	83	0	17	17
14	12.36	48	9480	88	0	12	12
15	13.25	51	6345	89	0	11	11
16	12.91	49	6860	91	0	9	9

---

Las ratas se manifestaron con estado normal de salud. Sin alteraciones físicas.

Grupo III. Ratas inoculadas con Escherichia coli. enterotoxigénica via intravenosa.

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
17	11.04	70	9750	41	0	59	59
18	11.77	66	7550	74	0	26	26
19	12.51	63	9650	71	0	29	29
20	12.88	63	7100	67	1	32	32
21	10.30	75	6400	70	0	30	30
22	11.15	68	7600	72	0	28	28
23	12.01	63	8100	71	0	29	29
24	11.56	61	9500	69	0	31	31
25	11.17	71	9300	70	0	30	30
26	10.45	66	7800	75	0	27	27

Las ratas se morían fácilmente (1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup>. día de inoculadas). Se mostraron agresivas presentando cuadros diarreicos y pelo erizado.

Grupo IV. Ratas Inoculadas con Escherichia coli. Enteroinvasiva  
Vía Intravenosa

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
27	18.40	49	16950	11	0	89	89
28	16.92	46	18600	49	0	51	51
29	17.14	47	15300	48	0	52	52
30	18.22	48	16810	47	0	53	53
31	18.21	47	15800	45	0	55	55
32	17.91	47	18100	52	0	48	48
33	18.19	48	17700	54	0	46	46
34	15.32	45	12000	48	0	52	52
35	17.55	46	17100	51	0	49	49

Las ratas morían fácilmente (1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> día de inoculadas) se mostraron menos agresivas que el Grupo III, y mostraron cuadros diarreicos.



Grupo V. Ratas Inoculadas con Cepa de Escherichia coli. Flora Normal. Vía Intravenosa y Cloruro de Calcio 0.5 g/ml por Vía Oral.

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
36	14.28	47	8500	83	0	17	17
37	11.42	50	7800	76	0	24	24
38	13.94	51	8920	87	0	13	13
39	11.40	54	9700	74	0	26	26
40	10.97	46	9100	48	0	52	52
41	12.51	52	8700	43	0	57	57

Las ratas morían con mayor dificultad (2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> días de inoculadas), no se mostraron agresivas.

Grupo VI. Ratas Inoculadas con Escherichia coli. Enteroinvasiva  
Vía Intrapencial y Cloruro de Calcio 0.5 g/ml por Vía Oral

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
42	14.72	59	7400	74	0	26	26
43	13.88	58	8200	83	0	17	17
44	14.41	55	7300	91	0	9	9
45	11.32	59	9225	76	0	24	24
46	12.14	65	6800	47	1	52	52
47	11.38	62	7500	66	0	34	34
48	12.50	66	6200	54	0	46	46
49	11.92	63	7100	72	0	28	28

Ratas menos agresivas y se presentaba la muerte de las ratas a tiempos más prolongados (2<sup>o</sup> y 3er. días de inoculadas).

Grupo VII. Ratas Inoculadas con Escherichia coli. Enterotoxigénica por Vía Intrapeneal y Cloruro de Calcio 0.5 g/ml por Vía Oral

<u>Rata N<sup>o</sup></u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
50	7.72	78	4700	86	0	14	14
51	10.67	68	5800	82	0	18	18
52	11.40	61	5500	17	0	83	83
53	8.54	65	5100	85	0	15	15
54	11.70	62	7400	89	0	11	11
55	9.11	66	6100	86	0	14	14

Ratas agresivas y morían fácilmente. [1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> día de inoculadas].

Grupo VIII. Ratas Inoculadas con Escherichia coli. Flora Normal  
Vía Intrapeneal (Vena Caudal)

<u>Rata</u> <u>Núm.</u>	<u>Hemoglobina</u>	<u>Hematocrito</u>	<u>Leucocito</u>	<u>Linfocito</u>	<u>Monocito</u>	<u>N T</u>	<u>Segmentados</u>
56	11.14	49	7800	78	0	22	22
57	12.36	57	8100	84	0	16	16
58	13.24	46	8500	91	0	9	9
59	12.89	52	9800	81	0	19	19
60	14.13	48	12500	76	0	14	14
61	11.48	51	9300	94	0	6	6
62	13.85	49	8300	77	0	23	23
63	12.96	54	7200	86	0	14	14

Las ratas morían pero no estaban agresivas (2<sup>a</sup> y 3er. días de inoculadas).

Para el análisis de discriminantes se organizaron las variables como a continuación se enumeran y los resultados de esta técnica multivariada son:

	<u>VARIABLES</u>	<u>TABLAS WILK'S</u>	<u>F</u>	<u>SIGNIFICANCIA</u>
Hemoglobina	$V_2$	0.152	43.80	0.0000
Hematocrito	$V_3$	0.069	104.7	0.0000
Leucocitos	$V_4$	0.133	51.13	0.0000
Linfocitos	$V_5$	0.464	9.051	0.0000
Monocitos	$V_6$	0.939	0.508	0.8256
Neutrófilos	$V_7$	0.456	9.33	0.0000
Segmentados	$V_8$	0.456	9.33	0.0000

Este análisis es efectuado con un intervalo de confianza al 95% y un nivel de significancia ( $\alpha$ ) menor al 0.05%. Por lo que se eligen las siguientes variables por ser las que tienen un valor mayor de significancia, en orden de importancia son:

$$V_3 > V_4 > V_2$$

Que significa: Hematocrito > Leucocitos > Hemoglobina

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

A partir de los datos experimentales tratados con la técnica de Análisis de Discriminantes, se interpretó lo siguiente: Que las variables más significativas con un nivel de significancia,  $\alpha \leq 0.05$  y un intervalo de confianza al 95% son:  $V_3 > V_4 > V_2$  correspondiendo a las variables: Hematocrito  $>$  Leucocitos  $>$  Hemoglobina y existiendo tres funciones discriminantes con un  $\alpha \leq 0.05$  y una confianza al 95%,  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$ .

Por conveniencia en el mapa territorial de funciones discriminantes, se eligió la función discriminante  $F_1$ , por la concordancia de las variables experimentales con la realidad. Con base en el mapa territorial de la función discriminante  $F_1$ .

El estudio se realizó en una macrocomputadora Borroughs 7800, instalada en el PUC de la UNAM en Cd. Universitaria.

La técnica del análisis de discriminantes, consiste en una técnica estadística multivariada, que requiere una variable contra la que se comparara contra el resto de variables que no se consideran puedan ser discriminatorias del estudio biológico.

Se realiza mediante una combinación lineal de las variables discriminantes, lo que nos dará la función discriminante  $D_i = d_{i1}z_1 + d_{i2}z_2 \dots + d_{ip}z_p$  de donde:  $D_i$  es la función discriminante (i).

$d_{ij}$  son los coeficientes que tienen un cierto peso sobre las variables analizadas para el estudio de la función discriminante (i).

$z_p$  son los valores estandarizados de las (p) variables discriminantes que se usan en el análisis.

La interpretación de los resultados depende de los datos arrojados del estudio multivariado realizado en la computadora.

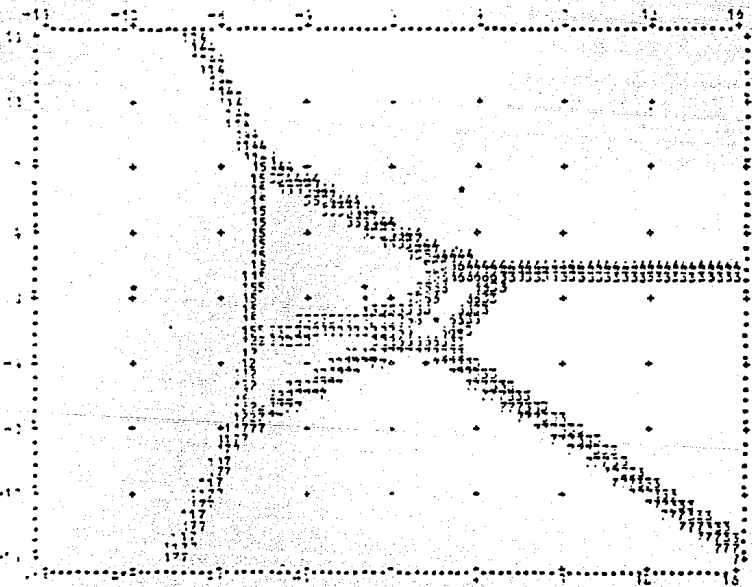
Cabe aclarar que todos los datos están sujetos a un intervalo de confianza al 95% y un nivel de significancia inferior o igual al 0.05 (36).

Se anexa gráfica (3).

G R A F I C A (3)

CANONICAL DISCRIMINANT FUNCTION 1

MAPA TERRITORIAL DE FUNCIONES DISCRIMINANTES  
DE LOS DATOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO





A PARTIR DEL ANALISIS DE DISCRIMINANTES SE INFIERE LO SIGUIENTE

Los niveles de leucocitos se mantienen normales como era de esperar en el grupo I, que corresponden al grupo testigo con solución salina al 0.85%, hay una tendencia ligera a aumentar los Leucocitos, Hemoglobina y Hematocrito.

En el grupo II de ratas, existe una tendencia moderada a aumentar los Leucocitos. Tenemos que el grupo V, inoculadas con flora normal vía intravenosa y cloruro de calcio vía oral, existe también una moderada tendencia a aumentar los Leucocitos. Lo mismo sucede en el grupo VI.

Definitivamente en los grupos III y IV la tendencia a aumentar los Leucocitos es clara, sin que exista un equilibrio o control de la infección. En el grupo VII, existe un aumento de los Leucocitos con una tendencia a disminuir la infección.

Con base en la interpretación de resultados estadísticos y de laboratorio se observa que existe una tendencia moderada del cloruro de calcio a controlar la infección causada por cepas de Escherichia coli. enteroinvasivas y enterotoxigénicas de los serotipos usados en el experimento.

Se observó que grupos inoculados con Escherichia coli. enterotoxigénica mantienen los niveles de Leucocitos elevados pero con tendencia a disminuir la infección, aún cuando la población de este grupo muere más rápidamente.

## CONCLUSIONES

A partir de la interpretación de resultados y el contraste de hipótesis, se llegó a las siguientes conclusiones:

1.- Este tipo de resultados nos muestra la probabilidad de usar la sal de cloruro de calcio en solución a una concentración específica no tóxica, como un agente bacteriostático que contrarreste infecciones causadas por Escherichia coli. enteroinvasivas y enterotoxigénicas como posible alternativa en el uso indiscriminado de antibióticos en infecciones gastrointestinales, ya que el abuso de antibióticos puede -- traer como consecuencias en niños recién nacidos, lo siguiente:

- Anemias
- Daños renales
- Reacciones alérgicas
- Resistencia a los antibióticos

El uso de la sal de cloruro de calcio más que provocar algún daño tóxico, podría favorecer el proceso de calcificación en los infantes de corta edad.

Las bondades que presenta el cloruro de calcio son las siguientes:

- a) Se encuentra en la estructura ósea como constituyente de los huesos y dientes, cuya función es darles resistencia y rigidez.
- b) La concentración de calcio (8.8-10.5 mg/100 ml) es necesaria para la coagulación en la sangre.

- c) Es un activador de sistemas enzimáticos durante la producción o activación final de la tromboplastina, por interacción de productos tromboplastínicos del sistema intrínseco o extrínseco con el factor V y X. Durante la transformación enzimática de protrombina en trombina bajo la acción de trombocinasa, durante la formación de trombina.
- d) Mantiene el tono y la irritabilidad muscular.

DE LAS HIPOTESIS PODEMOS CONCLUIR LO SIGUIENTE:

- 1) Las sales de sulfatos no funcionaron a niveles de laboratorio, probablemente por la complejidad de la molécula y el poco uso biológico que la sal tiene.

En contraste con los cloruros que son moléculas más simples y comunes en los procesos biológicos, con la hipótesis, (las sales de cloruros y sulfatos preparados a una dosis conocida no tóxica para el animal, pueden funcionar como bactericidas y/o bacteriostáticos contra la Escherichia coli.). Se comprueba que la sal de cloruro de calcio es la única efectiva y actúa como un agente bacteriostático, porque solo inhibe el crecimiento bacteriano.

- 2) Se comprobó que el cloruro de calcio en nuestras pruebas de laboratorio se comportó como un bacteriostático y mediante las biometrías hemáticas y el cuadro clínico, no presentó efectos tóxicos colaterales.

Por lo antes expuesto se puede concluir que es probable combatir infecciones causadas por Escherichia coli, enterotoxigénica o enteroinvasiva empleando soluciones orales de cloruro de calcio a una concentración específica que no sea tóxica.

Los problemas que podría traer el exceso de calcio son:

- a) Calcificación excesiva de huesos y dientes.
- b) Formación de cálculos en vías urinarias.
- c) Hipercalcemia.

Para comprobar todo lo anterior, se tendría que realizar a futuro ensayos para apoyar o descartar el uso de esta sal.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Herrero, F.J. Action of Cations on the Growth of Bacteria; A New Method of Study. Arch Farm. Bioquim. 2, 239-318 (1945).
- 2.- Koulumies, R. The Action of the Metal Chlorides of the Second Group of the Periodic System on Various Microorganisms. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 2, 1-89 (1946).
- 3.- Alha, A.R. Studies on the Relative Resistance of Germs to the Salts of Group I of the Periodic Table. Acta Path. Microbiol. Scand Suppl. 65, 1-74 (1946).
- 4.- Fisichella, G.B. Influence of Some Cations on the Vitality of Escherichia coli. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 15, 768-9 (1940).
- 5.- Perault, R. Action the Sulfanilamide in Escherichia coli. Compt. Rend. Soc. Biol. 137, 598-600 (1943).
- 6.- Shanas, B. The LD<sub>50</sub> Oral on Rats of Sodium Chlorides. Arch. Int. Pharmacodyn. 144, 186 (1963).
- 7.- Spector, W. S. The LD<sub>50</sub> Oral on Rats of Calcium Chlorides Handbook of Toxicology Vol. 1 (1956).
- 8.- Konwiser, J. The LDIV on Rats of Magnesium Chlorides. Lab. Clin. Med. 15, 34 (1929).
- 9.- Windholz, M. The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals Drugs, - -  
pages. 210, 737, 739, 1111, 1121, Editor Published by Merck J. Co. -  
U.S.A. (1975).
- 10.- Merck, E. Diagnóstico de Laboratorio en Medicina Veterinaria. Diagnóstico Merck. (1975).
- 11.- Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología en Escuelas de Medicina A.C. Microbiología Médica, pages. 520-527. Comité Editorial Tomo I (1981).

- 12.- Lynch, R. *Métodos de Laboratorio*. 2a. Edición Edt. Interamericana. pags. 917-918 [1974].
- 13.- Blair, E.J. et. *All Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Baltimore (1970).
- 14.- Ellner, P. *Current Concepts and Laboratory Procedures. Infectious Diarrheal Diseases*. Ind. New York (1984).
- 15.- Edward, P. R. and Edwing, W. H. *Identification of Enterobacteriaceae* 3a. Ed. Burgess, Publishing Company, U.S.A. (1972).
- 16.- Macfaddin, J.F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Baltimore (1976).
- 17.- Kauffmann, F. *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*. Munks Gaard - Copenhagen (1966).
- 18.- Volken, R.H. et. all *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay for Detection of Escherichia coli. Heatlabile Enterotoxin*. *Journal of Clinical Microbiology* 6, 5 (1977).
- 19.- Guerrant, R.L. et. all *Clic. Adenosine Monophosphate and Alteration of Chimise Hamstero Vary Cell Morphology a Rapid Sensitive in Vitro Assay for the Enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infection and Immunity*. 10, 2 (1974).
- 20.- Guerrant, R. L. *Characterization of the Chimise Hamster Ovary Cell Assay for the Enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. and for Antitoxin; Differential Inhibition by Gangliosides. Specific Antisera and Toxoid*. *The Journal of Infectious Diseases*. 135, 5 (1978)
- 21.- Field, M. *Nodes of Action of Enterotoxin from Vibrio cholerae and Escherichia coli*. 1, 918 (1979).
- 22.- Sack, R. B. *Auman Diarrheal Disease Caused by Enterotoxigenic Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 333 (1975).

- 23.- Alderete, J. F. and Robertson, D.C. Purification and Chemical Characterization of the Heat-Stable Enterotoxin Produced by Porcine Strains of Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 19, 1021 (1978).
- 24.- Guerrant, R.L. Role of CVCL in the Action of Heat-Stable Enterotoxin of Escherichia coli. Nature. 271, 755 (1978).
- 25.- Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology 8a. Ed. the Williams, et. Wilkins, Baltimore (1974).
- 26.- Lincon, C. CH. Et. all. A Prospective Study of the Risk of Diarrheal - Disease Accordind to the Nutritional Status of Children. American Journal of Epidemiology 114, 2 (1981).
- 27.- Arbeter, A. Dy Cols Nutrition and Infection Fed. Proc. 30, 1421-1428 (1971).
- 28.- Philips, S. F. Diarrhea; Acurrent View of the Pathophysiology, Gastroenterology 63, 495 (1972).
- 29.- Dupont, H.L. Infections of the Gastrointestinal Tract. Plenum Publishing Corporation, New York (1984).
- 30.- Manual de Prácticas de Laboratorio de Hematología. E.N.E.P. - Zaragoza. (1982).
- 31.- Edwin, H. Lennette. Et. all Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Baltimore. Segunda Edición, 933 (1978).
- 32.- Todd Sanford. Et. all. Diagnóstico Clínico para el Laboratorio. Sexta Edición. Editorial Salvat, 991 (1978).
- 33.- Mejía Albarrán, María Elena. (Tesis) Estudio Comparativo de Microorganismos Presentes en Niños con Diarrea Aguda y en Niños Normales y su Relación con el Estado Nutricional. E.N.E.P.-Zaragoza, México 1985.
- 34.- Manual de Prácticas de Postgraduados del Departamento de Inmunología de la E.N.C.B., I.P.N. 20-25, 99-95, 104-114 (1975).
- 35.- F.G. Valdecasas, J. Laporte, J. A. Salva. Et. all. Bases Farmacológicas de la Terapéutica Medicamentosa. Salvat Editores, S.A. (53-56, 98-104). (1968).

36.- *Statistical Package For the Social Sciences, Second Edition, Ed. Mc.*  
*Graw-Hill Book Co. [1980] USA.*