

80  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

DETERMINACION DEL EFECTO DEL  
POLIANETOLSULFONATO DE SODIO SOBRE LA  
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PEFLOXACINA

TESIS CON  
FALLA EN CALIFICACION

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**CLAUDIA MARTINEZ CONTRERAS**





## **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 T R O D U C C I O N

En años recientes se han sintetizado derivados del ácido nalidixico, denominados 4-quinolonas o fluorquinolonas, entre las cuales se pueden mencionar a: pefloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, etc. Todas ellas presentan características similares en cuanto a su estructura y a su actividad antimicrobiana (1).

La pefloxacina (ácido etil-1 fluoro 6(metil-4 piperazinil-1) 7 oxo- 4 dihidro-1, 4 quinoleína-3 carboxílico) es una de las nuevas quinolonas que, a las dosis terapéuticas ejerce una acción bactericida por inhibición específica de la replicación del ADN bacteriano, por medio de una interacción con la sub-unidad de la ADN girasa responsable de la organización topológica del ADN bacteriano (1). Es importante hacer notar que esta inhibición es 10 veces más potente que la del ácido oxolinico y 100 veces más potente que la del ácido nalidixico (3).

La amplia cobertura antimicrobiana de la pefloxacina le ha permitido ser utilizada en distintos estudios en infecciones de diferentes sistemas orgánicos y de distinta magnitud, con pocos efectos colaterales y resultados alentadores.

El polianetol sulfonato de sodio (SPS) es un anticoagulante que inhibe la actividad bacteriana de la sangre, por lo que

se usa generalmente en hemocultivos. Cuando se presenta una pequeña cantidad de microorganismos en la muestra sanguínea, el uso del polianetolsulfonato de sodio permite una mejor recuperación de estos organismos

El SPS también tiene la característica de inhibir la acción antimicrobiana de algunos antibióticos, entre ellos están los aminoglucósidos, tales como: gentamicina, kanamicina, amikacina, Aún no se conoce la acción del polianetolsulfonato de sodio sobre las quinolonas.

Con el fin de determinar variaciones en la acción bactericida de la pefloxacina en diversas condiciones, en este estudio se efectuaron diversas pruebas, las cuales fueron: determinar el efecto del SPS sobre la pefloxacina y amikacina utilizando dos diferentes metodologías: dilución en tubo y técnica en microplacas; así como bioensayo, determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida y curva de muerte para pefloxacina.

## P E F L O X A C I N A

### HISTORIA

La quimioterapia antibacteriana empezó con las sulfonamidas durante la década de los 30's. Durante las cinco décadas siguientes hubo cambios en los tipos de infección encontrados, así como una alta susceptibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos, lo cual estimuló una búsqueda progresiva de antibióticos de amplio espectro que proporcionaran alternativas terapéuticas más activas. En ésta búsqueda se encontró la penicilina G durante los 40's, seguida por la eritromicina, tetraciclina y vancomicina en la década siguiente. Las penicilinas antiestafilocócicas y las cefalosporinas aparecieron durante los 60's, al incrementarse la frecuencia de las infecciones intrahospitalarias producidas por estafilococos y microorganismos Gram negativos (1).

En esta misma década, Lescher y col. (1962) descubrieron el ácido nalidixico que es el precursor de las 4-quinolonas. Casualmente (3) descubrió durante la síntesis de la cloroquina que el ácido nalidixico presentaba actividad contra las bacterias Gram negativas. Sin embargo, se encontró que había baja concentración del mismo tanto en suero como en tejidos a consecuencia de que se presenta enlace con las proteínas del organismo; además de que la concentración mínima inhibitoria

(MIC) era de 4 a 16 mcg/ml, lo cual limitaba la utilidad del ácido nalidixico en el tratamiento de las infecciones sistémicas (1, 3)

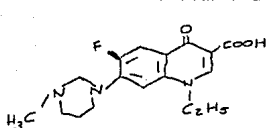
El desarrollo de las 4-quinolonas progresó lentamente, así pues sólo el ácido oxolínico y la cinoxacina fueron las 4-quinolonas introducidas durante los 70's, teniendo como base el ácido nalidixico. El progreso en el desarrollo de las quinolonas se dió con la introducción de flúor en el núcleo básico (3).

En 1981 empezaron a aparecer publicaciones sobre un grupo de quinolonas, las fluoroquinolonas, que in vitro eran mucho más activas y presentaban un espectro de acción mucho más amplio; entre sus ventajas encontramos: aparición de resistencia poco frecuente; toxicidad potencial y efectos secundarios poco significativos. Puede utilizarse en infecciones urinarias y posibilidad de su empleo en infecciones respiratorias, sistémicas y otras; metabolización entre el 60 y 3%, según preparado. El número de nuevos preparados descritos en el momento actual es superior a 25. Las mejor estudiadas son: norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacina, ofloxacina, pefloxacina y amifloxacina (3).

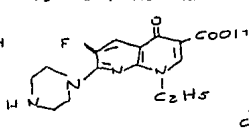
Se reúnen bajo la denominación de quinolonas, preparados que comparten un núcleo 4-quinolona y un sustituyente carboxilado en

posición 3. Las seis fluorquinolonas antes mencionadas comparten entre sí un átomo de flúor, un anillo de piperacina (6-flúor-7-piperacino-4 quinolona-3-carboxilada) y un carbono en posición 8, excepto la enoxacina. Se diferencian entre sí por los radicales unidos al 1-N de la quinolona y al grupo piperacina. A pesar de las diferencias químico-estructurales se ha convenido en la denominación genérica de quinolonas o 4-quinolonas para todos los preparados (3). También se les conoce como análogos del ácido nalidíxico por haber sido la primera sustancia descubierta y como inhibidores de la girasa, atendiendo a su mecanismo de acción que es común.

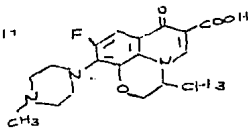
Estructuras de algunas quinolonas:



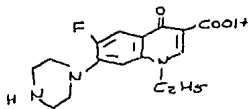
Pefloxacina



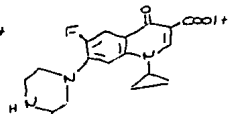
Enoxacina



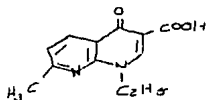
Ofloxacina



Norfloxacina



Ciprofloxacina



Acido nalidíxico

## Mecanismo y blanco de acción

Las quinolonas son preparados de acción bactericida rápida (4). El blanco de acción del ácido nalidixico y, probablemente de todas las quinolonas, es la ADN girasa (topoisomerasa II) descubierta por Gellert et al en 1976 en Escherichia coli. La función principal de esta enzima bacteriana es mantener el superenrollamiento del ADN (5). Para explicar el modo de acción sugerido sobre el ADN cromosómico bacteriana se hará una somera descripción de como éste se estructura en la bacteria y de las características de la ADN girasa.

### a) Cromosoma bacteriano.

Las bacterias tienen un solo cromosoma; que es una gran molécula circular cerrada, constituida por una doble cadena de ADN arrollada en espiral. En Escherichia coli tiene una longitud de 1.3 mcm. Esta molécula debe ubicarse en el interior de una estructura de 2 mcm X 1 mcm, dimensiones de la pared del colibacilo. En 1974, Worcel señalaba que, el ADN se plegaba de una manera organizada (3), en unas 65 regiones topológicamente independientes llamadas dominios sobre una estructura central (core) de ARN. En una segunda fase el ADN se condensa o compacta por retorciamento, dominio a dominio (asas de superenrollamiento). Este retorciamento o superenrollamiento tiene lugar en sentido contrario a la dirección en que las hebras



del ADN están enrolladas en su forma lineal, de ahí que se denomine giros negativos. El número de retorcimientos o superenrollamientos introducidos en cada dominio es de unos 400. Los dominios del cromosoma se superenrollan simultánea pero separadamente; para que esto pueda ocurrir, la molécula de ADN se corta transitoriamente a nivel de los dominios (se producen dos cortes, uno en cada hebra complementaria, separados por cuatro pares de bases). El corte escalonado de las dos hebras da como resultado que en los extremos de los cortes la hebras estén separadas. Cuando el superenrollamiento ha terminado los extremos de los dominios se engarzan, hebra a hebra, y se restablece la continuidad de la molécula de ADN.

b) ADN girasa bacteriana.

La ADN girasa o topoisomerasa II es la enzima que se encarga de mantener en las bacterias el superenrollamiento del ADN cromosómico. Se conocen dos topoisomerasas la I y la II. La topoisomerasa I está codificada por top A. La topoisomerasa II o ADN girasa de Escherichia coli consta de cuatro subunidades (3), dos subunidades A de 105,000 daltones codificadas por el gen gyr A (antes nal A) y dos B de 95,000 daltones codificadas por el gen gyr B (antes gyr).

Las subunidades A cortan, dominio a dominio, cada hebra de ADN. El ADN de cada dominio se superenrolla negativamente por

acción de las subunidades B, gastando moléculas de ATP. Finalmente, cada dominio es conveniente y ordenadamente sellado con el del dominio vecino por las subunidades A que antes los separaron.

Se postula que las 4-quinolonas actúan previniendo la acción final de sellado que las subunidades A de la ADN-girasa realizan en los cortes que habían hecho antes de iniciarse el superenrollamiento. Es probable que la acción bactericida esté en relación con los cortes a nivel del cromosoma bacteriano; ya que se ha señalado que los extremos sueltos de los cortes del ADN actuarían como señal inductora de la producción de exonucleasas que provocarían la muerte bacteriana.

Las quinolonas inhiben específicamente la función de las subunidades A. La cumaricina y novobiocina inhiben la función de las subunidades B. La actividad de las quinolonas es antagonizada por la rifampicina y el cloramfenicol (salvo para la ciprofloxacina y ofloxacina) lo cual sugiere que de alguna manera podría tener relación también con la síntesis proteica (3).

c) Toxicidad selectiva de las 4-quinolonas.

El ADN cromosómico de las células humanas es similar en su estructura y composición al ADN bacteriano, aunque la organización es diferente (3). Cada uno de los 46 cromosomas tiene también que condensarse, ya que la longitud total del ADN

de los cromosomas del núcleo suma unos 189 cms y el tamaño medio de las células humanas es de 10 micrometros. En la reducción interviene una topoisomerasa II parecida a la ADN-girasa bacteriana. Esta topoisomerasa II actúa en la primera fase de la reducción, consta sólo de dos subunidades de 172.000 daltons y es poco sensible a la acción de las 4-quinolonas; la topoisomerasa II bacteriana es aproximadamente 100 veces más sensible a la inhibición por ciprofloxacina y ofloxacina que la correspondiente topoisomerasa II de las células eucariotas (6).

#### **Actividad antibacteriana**

Las 4-quinolonas tienen una gran cantidad de elementos estructurales en común y no es sorprendente que tengan efectos similares sobre las bacterias; aunque es importante mencionar que hay marcadas diferencias en actividad en relación a la dosis del antibiótico (5). Estos antibióticos son bactericidas, pero existe un aspecto curioso en su acción, y es que mientras las bacterias se están muriendo comienzan a elongarse anormalmente formando largos filamentos (7). En consecuencia, la muerte bacteriana por las 4-quinolonas no puede ser determinada por densidad óptica pues cada medida apenas refleja cambio en la masa bacteriana, lo cual, debido a la acción de éste antibiótico sobre la síntesis de ADN, está raramente separado de la viabilidad bacteriana. Además se debe tener sumo cuidado cuando se

determina la concentración mínima inhibitoria de las 4-quinolonas por el método de dilución en caldo, especialmente cuando se utilizan inóculos grandes, porque el aumento en la turbidez del caldo puede interpretarse como multiplicación bacteriana (7).

Las fluoroquinolonas son preparados muy activos. Inhiben las enterobacterias con concentraciones de 0.02-1.0 mcg/ml (las cepas de enterobacterias más sensibles al ácido nalidixico requieren 2 mcg/ml). Las más activas son la ciprofloxacina y la ofloxacina. Su espectro de actividad es muy amplio, alcanzando a la mayoría de bacterias Gram negativas y positivas aerobias y facultativas. Su eficacia es menor sobre las bacterias anaerobias, sobre algunos bacilos Gram negativos no fermentadores y sobre algunas de las micobacterias "atípicas". La actividad sobre los estreptococos varía en los distintos preparados. ofloxacina y ciprofloxacina son activas incluso sobre Streptococcus faecalis (concentración mínima inhibitoria, 2 mcg/ml) (6).

La concentración bactericida mínima de las fluorquinolonas para casi todas las bacterias sensibles es de dos a ocho veces la de la concentración inhibitoria mínima. Los pH inferiores a 5 disminuyen la eficacia de estos preparados, que es óptima a pH 7-8 (11).

Las 4-quinolonas son bactericidas, pero presentan una

característica curiosa y es que cuando se prueban sobre una variedad de concentraciones usando un intervalo simple de tiempo, la proporción de bacterias que sobreviven al tratamiento siempre sigue una respuesta bifásica porque éstos antibióticos muestran una concentración sencilla más bactericida, de tal forma que las concentraciones más grandes o más pequeñas que éstas causan menos muerte bacteriana. Existe una concentración de antibiótico (4-quinolonas) en la que se observa un efecto más bactericida, en esta fase hay una inhibición progresiva de la síntesis de ADN, la cual induce un efecto bactericida; en concentraciones menores se determina un efecto bacteriostático y en concentraciones más altas ocurre una segunda fase en la que el antibiótico se vuelve progresivamente menos bactericida (8).

#### Interacciones de las 4-quinolonas

##### a) Con iones.

Aunque la presencia de suero no tiene efecto significativo en la actividad antibacteriana de las 4-quinolonas, los antibióticos son mucho menos activos en orina que en medios nutritivos. La causa puede ser que la orina tiene una alta concentración de magnesio (7) y el cambio en el pH urinario provoca variaciones en la actividad de las 4-quinolonas.

La orina no es el único medio fisiológico en el que el pH puede variar. El pH del esputo en infecciones del aparato

respiratorio y de la médula ósea en osteomielitis puede ser significativamente menor al pH neutro, por lo que se debe valorar la variación en la potencia de las 4-quinolonas para determinar si pueden ser utilizadas en el tratamiento de las infecciones antes mencionadas.

Hay otras consideraciones terapéuticas con respecto a las interacciones de las 4-quinolonas con magnesio. Höffken, Fleming y Shentag (9) encontraron que cuando las flúorquinolonas eran administradas por vía oral simultáneamente con antiácidos que contenían magnesio y aluminio, la absorción de las 4-quinolonas hacia la sangre estaba considerablemente disminuida. Höffken et al sugirió que como el magnesio antagonizaba con las quinolonas al actuar sobre las bacterias, un fenómeno similar podía ocurrir en los humanos; también sugirió que el aluminio podía ser el responsable. Esta última aseveración parece ser correcta pues más tarde se encontró que un antiácido conteniendo sólo aluminio también reducía considerablemente la absorción de la pefloxacina (9).

Es probable que el antagonismo de las 4-quinolonas con los metales polivalentes ocurra debido a la formación de complejos que son menos capaces de interactuar con las bacterias, que el antibiótico libre y quizá complejos similares pueden alterar la absorción de las 4-quinolonas en el tracto gastrointestinal humano (9).

b) Interacciones de las 4-quinolonas con otros antibacterianos.

Aunque las 4-quinolonas son usadas generalmente como agentes antibacterianos únicos, han sido utilizados cada vez más en combinación con otros antibacterianos para ampliar su espectro antimicrobiano, particularmente en pacientes neutropénicos y para evitar el surgimiento de microorganismo resistentes a las 4-quinolonas durante la terapia.

Obviamente, el segundo antibacteriano utilizado junto con la fluorquinolona no debe presentar antagonismo. Estudios en concentración mínima inhibitoria parecen indicar que ocurre una pequeña interacción entre las 4-quinolonas y otros antibióticos (11). Sin embargo, MIC sólo da información acerca de la inhibición de la multiplicación bacteriana y no provee información del proceso de destrucción bacteriana (7).

Se ha encontrado que tanto el cloranfenicol (inhibidor de la síntesis de proteínas) como la rifampicina (inhibidor de la síntesis de RNA), ejercen un efecto antagonista sobre la actividad bactericida de las 4-quinolonas; aunque no parecen afectar su actividad bacteriostática (10).

Los aminoglucósidos también son inhibidores de la síntesis proteica y antagonizan la actividad bactericida de las 4-quinolonas. Por el contrario, una concentración sub-inhibitoria del D-aminoglucósido, tobramicina (0.4mcg/ml), es capaz de

aumentar la actividad bactericida de 50 mcg/ml de ácido nalidixico y de 0.15 mcg/ml de pefloxacina (10).

La combinación de una 4-quinolona y un aminoglucósido parece ser particularmente ventajosa debido a que se aumenta la actividad bactericida de la 4-quinolona y puede ser útil en el tratamiento de pacientes que presenten menoscabo en su sistema inmune. Por otro lado, el uso de inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas (con excepción de los aminoglucósidos) junto con las 4-quinolonas, no es aconsejable por su antagonismo en la actividad bactericida (7).

#### Resistencia

Las 4-quinolonas son raramente afectadas por la resistencia mediada por plásmidos, lo cual es poco usual entre los agentes antibacterianos, y quizá por esta razón la resistencia clínica a las 4-quinolonas es mucho menor que la existente en otro grupo de agentes antibióticos y quimioterapéuticos (10).

El único mecanismo conocido de resistencia adquirida es la mutación en los genes cromosómicos. Los genes de Escherichia coli cuyas mutaciones pueden alterar la sensibilidad a las 4-quinolonas son: gyr A (nal A) altera la subunidad A de la ADN girasa, afecta a todas las quinolonas y es la mutación que da lugar a mayor grado de resistencia; nal B, reduce la permeabilidad de la membrana externa para algunas quinolonas (2,5).



Se sabe poco acerca de la resistencia a las fluorquinolonas. Para el ácido nalidixico la resistencia que es afectada por la subunidad A ocurre en un solo paso y con una frecuencia muy baja y afecta a todas las quinolonas; el hecho de que las fluorquinolonas sean tan activas hace que, por ejemplo, a nivel de enterobacterias no sea significativa (2), ya que las cepas mutadas se inhiben con concentraciones que son aún asequibles con dosis terapéuticas. Sin embargo, en estudios *in vitro*, las bacterias seleccionadas por su resistencia a una de las fluorquinolonas son menos sensibles a las otras y se ha descrito una mutación espontánea de baja frecuencia, en un solo paso que afortunadamente se selecciona con dificultad (5,11).

#### Farmacocinética

Todas las fluorquinolonas son sustancias de bajo peso molecular que se caracterizan por su excelente absorción oral y con una biodisponibilidad entre el 50-93%. Después de dosis de 400-600 mg por vía oral las concentraciones séricas más bajas se obtienen con ciprofloxacina, 3mcg/ml; con ofloxacina se alcanzan hasta 1mcg/ml.

La ciprofloxacina, enoxacina y pefloxacina pueden administrarse también por vía parenteral (intravenosa); las concentraciones séricas que se consiguen son similares a las obtenidas tras administración oral (4, 12). La fijación a las

proteínas séricas es del 30%.

La distribución en los diferentes líquidos orgánicos es excelente, difunde a LCR, líquido pleural, peritoneal, prostático, secreción bronquial y esputos y hay buena penetración intracelular. En saliva, lágrimas, esputos y en la leche materna se han señalado concentraciones superiores al 50% de la del suero así como concentraciones elevadas en el líquido amniótico y en el cordón umbilical. Difunden bien en los exudados inflamatorios (4).

La biotransformación de las fluorquinolonas suele ser discreta, en norfloxacin y ciprofloxacina se han descrito hasta seis metabolitos, algunos con actividad antibacteriana; ofloxacina apenas se metaboliza (12). La excreción se hace fundamentalmente a través de riñón. La eliminación en forma activa de la dosis administrada es del 98% para ofloxacina, superior al 50% para ciprofloxacina y entre el 30-40% para pefloxacina, con concentraciones de sustancia activa en riñón superiores a 100 veces la del suero (4). Las alteraciones de la función renal retardan la eliminación urinaria (12).

La excreción por heces varía según el preparado: para ofloxacina es de 3.9% de la dosis administrada y del 30% para pefloxacina y ciprofloxacina.

La vida media de las fluorquinolonas se evalúa entre 3-8

horas según el preparado: 3-4 hrs. para norfloxacin y ciprofloxacina, 6-7 para enoxacina y ofloxacina y hasta 8 horas para pefloxacina (4); hay variaciones significativas de un paciente a otro. La prolongada vida media de las fluorquinolonas permite intervalos de administración entre 8 y 12 horas.

#### Efectos adversos y toxicidad

La administración oral de las fluorquinolonas es muy bien tolerada. Efectos secundarios en voluntarios sanos tras la administración de fluorquinolonas se han observado en un 10% aproximadamente de los individuos tratados y han sido casi siempre leves (4, 13). No se han observado alteraciones graves de la flora intestinal, ya que las bacterias anaerobias son poco sensibles.

Estudios recientes con animales indican que la enoxacina provocaría una acumulación indeseable de cafeína en aquellos sujetos que la consumen. Estos efectos están relacionados probablemente con una inhibición a nivel del metabolismo hepático ligado a isoenzimas del citocromo P 450 (14).

Se está estudiando *in vitro* la influencia de las fluorquinolonas en la blastogénesis de los linfocitos y en la producción de interferón gamma así como su posible influencia sobre la fagocitosis (15).

En animales tratados con fluorquinolonas se han observado alteraciones del cartilago de crecimiento en las articulaciones, asimismo se ha observado cristaluria tras el empleo de dosis elevadas de estos preparados (13).

#### Aplicaciones de las fluorquinolonas

De acuerdo con su espectro in vitro la mayoría de las bacterias son sensibles a las fluorquinolonas.

Las fluorquinolonas son activas sobre la mayoría de las bacterias responsables de infecciones urinarias. Con ofloxacin y pefloxacin se han obtenido porcentajes de curación próximos al 100% con dosis única y en infecciones complicadas entre el 33 y el 100% (4).

La segunda indicación de las fluorquinolonas, en especial de la ciprofloxacina y ofloxacin, son las infecciones bacterianas de vías respiratorias bajas.

Para el tratamiento de procesos gastroenteríticos agudos son útiles todos los preparados. Se está ensayando el empleo de pefloxacin en el tratamiento de fiebre tifoidea y en el control de portadores de Salmonella typhi (4).

En las infecciones bacterianas ginecológicas y en las de transmisión sexual se han obtenido también buenos resultados. Para la gonorrea se ha ensayado tratamiento con dosis únicas de

pefloxacina.

Como contraindicación del empleo de las fluorquinolonas se señala la hipersensibilidad a las mismas, la insuficiencia renal grave (4), los menores de 18 años, el embarazo y la lactancia (las tres últimas contraindicaciones en relación con las alteraciones del cartilago de crecimiento observado en animales).

Se recomienda no emplearlas en infecciones urinarias no complicadas ni en procesos infecciosos que respondan bien a otros antibacterianos, para evitar la selección de cepas mutantes poco sensibles o resistentes.

## CAPITULO 2

## POLIANETOLSULFONATO DE SODIO

Es esencial poder recobrar microorganismos de la sangre de pacientes con bacteremia para un buen manejo médico. Entre los factores que limitan el aislamiento de microorganismos viables se encuentran: la actividad bactericida por factores séricos y por leucocitos; una vez que la sangre ha sido extraída.

El polianetolsulfonato de sodio (SPS) es un anticoagulante polianiónico que inhibe la actividad bactericida sanguínea. Von Haerber y Miles, en 1938, demostraron que una pequeña cantidad de bacterias que fueran inoculadas en sangre desfibrinada en presencia de SPS podían reproducirse en incubación a 37 °C, mientras que si el SPS no hubiera estado presente los microorganismos habrían sido destruidos rápidamente. Estudios posteriores sugirieron que el SPS es un compuesto muy útil que se puede adicionar a hemocultivos para inhibir la actividad bactericida del suero (17).

El polianetolsulfonato de sodio (SPS) es un anticoagulante sintético que es anticomplementario y antifagocítico. Este compuesto también inhibe la actividad de la estreptomina, polimixina B, sulfato de kanamicina y sulfato de gentamicina (18). Watsworth et al reportaron que 0.005% (50 mcg/ml) de SPS eliminaban la actividad complementaria en el suero diluido 1:10 del cerdo de guinea. Estudios anteriores indicaron que 250 mcg

(0.025%) de SPS por ml neutralizaban la actividad bactericida de suero humano diluido 1:2 (19). Algunos estudios de inmunodifusión fueron útiles para determinar cuales componentes del suero humano fresco e inactivado por calor eran precipitados por SPS. Anteriormente, Burstein y Samaille demostraron que las beta lipoproteínas eran precipitadas por polianetol sulfonato de sodio en el suero humano. Algunos años antes, Zunz et al., habian demostrado que el SPS precipitaba el fibrinógeno (17).

Se han realizado estudios de inmunodifusión, los cuales han demostrado que el SPS también precipita los componentes del complemento C3 y C4 del suero humano, previamente Pontier et al. revelaron que el SPS inactivaba C3 en el suero porcino. Por lo tanto, la actividad anticomplementaria del SPS se debe a la precipitación de los dos últimos componentes del complemento humano, llamados C3 y C4 (18).

El SPS precipita IgG del suero humano. Sin embargo, se encontró que el sobrenadante, después de haber tratado el suero con SPS, todavía contiene IgG así como otras proteínas que fueron detectadas en el precipitado, lo cual indica que la precipitación es incompleta. Stuart (17) observó que el suero tratado con SPS aún podía ser empleado para pruebas de aglutinación; aparentemente el SPS precipitaba únicamente una insignificante cantidad de IgM, lo cual no causaba reducción en el título de



aglutininas anti-Salmonella. Los anticuerpos antiestreptolisina D, pertenecen a la clase IgG de las inmunoglobulinas, por lo que al efectuar la titulación ASTO utilizando un control tratado con SPS, se detecta una marcada disminución en los títulos debido a que la precipitación de IgG por SPS era incompleta (18).

El SPS, en concentraciones usadas comúnmente en hemocultivos, inhibe completamente la destrucción de Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis por leucocitos aislados. Este efecto se debe a la inhibición de la fagocitosis más que a la inhibición de los mecanismos intracelulares bactericidas. Se requiere suero como una fuente de opsoninas para la fagocitosis de bacterias mediada por leucocitos. La inhibición de la fagocitosis por polianetolsulfonato de sodio depende de los requerimientos séricos (17).

Una evidencia de la inhibición de la fagocitosis mediada por suero en presencia de SPS, fué obtenida en un estudio del efecto del SPS en el tratamiento del yoduro por leucocitos intactos. El yoduro inorgánico es convertido en ácido tricloroacético precipitable por leucocitos intactos que han ingerido una partícula apropiada como el zymosan (el zymosan forma parte de la estructura de los parásitos y activa al complemento por la vía alterna). El suero es requerido para la opsonización. Los frotis preparados al final de la incubación indican una completa inhibición de la fagocitosis debida a la presencia del SPS. Esta

inhibición es eliminada cuando los leucocitos son preincubados con zymosan y suero por 15 minutos, antes de la adición del polianetolsulfonato de sodio y del yoduro. La fagocitosis se lleva a cabo durante la preincubación; así que el efecto inhibitorio del SPS en el tratamiento del yoduro, sin efectuarse la preincubación, se debe principalmente a la inhibición de la fagocitosis y no a la inhibición intracelular de las reacciones de tratamiento del yodo (17).

El SPS también ejerce un efecto directo sobre la actividad metabólica de los leucocitos. Esto incrementa la oxidación del C-1 de la glucosa del resto de los leucocitos, pero no de los leucocitos que fagocitan, y aumenta en forma significativa la oxidación formiato por medio de ambos leucocitos, tanto los restantes como los que fagocitan. El mecanismo de la estimulación metabólica del SPS se desconoce. Un aumento en la oxidación de la glucosa restante ocurre al exponer los leucocitos a diferentes sustancias, por ejemplo, agentes surfactantes: fosfolipasa C, que reaccionan con la membrana plasmática y aparentemente provocan una respuesta similar a la fagocitosis. El SPS puede actuar de manera similar. Cualquiera que sea el mecanismo, estas alteraciones metabólicas no tienen relación aparente con la inhibición de la función fagocítica por medio del SPS (17).

**CAPITULO 3**

## PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Las pruebas de sensibilidad son la parte más importante y abundante de las pruebas de laboratorio clínico pedidas para ayudar al médico en la elección de quimioterapéuticos. Puede ser necesario suplementarlas con otros procedimientos en ciertas situaciones clínicas complejas, especialmente en endocarditis bacteriana subaguda y en infecciones severas de pacientes inmunológicamente comprometidos. En estos casos, la determinación de concentraciones bactericidas o del efecto de las combinaciones de antimicrobianos puede ser de utilidad. Las pruebas directas de la capacidad del antimicrobiano en el suero del paciente para inhibir o matar al organismo infectante también pueden ser útiles para supervisar la eficacia de las dosis empleadas (20).

Cada vez es más necesario determinar la cantidad del antimicrobiano presente en suero, orina, otros líquidos o tejidos. En la práctica clínica esto se aplica particularmente a agentes como gentamicina, tobramicina y amikacina, cuyos niveles potencialmente tóxicos y terapéuticos están muy próximos entre sí. Por eso, se necesitan análisis séricos para asegurar que las concentraciones antimicrobianas sanguíneas están dentro de límites seguros pero efectivos. Esto se verifica en especial en pacientes con déficit renal, cuyos niveles séricos de antimicrobianos pueden ser menos previsible (20).

Entre las pruebas de sensibilidad se tienen: MIC, MBC, curva de muerte y bioensayo.

Quando se determina la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un antibiótico hacia un microorganismo susceptible por medio del método de dilución en caldo, se toma como punto final la menor concentración del antimicrobiano en el que no se detecta crecimiento visible. Sin embargo, un sub-cultivo en un medio libre de antibiótico mostrará que algunas veces este proceso de inhibición es reversible y que organismos vivos pueden recobrase del tubo que presentaba el nivel MIC y esto puede suceder en diluciones más altas. Lo antes mencionado se espera en los antibióticos cuya acción es bacteriostática, en el caso de los antimicrobianos bactericidas habrá una concentración en la que no pueden existir sobrevivientes. Este efecto puede ser medido en el laboratorio y determina la proporción de sobrevivientes después de 20 a 24 horas de incubación en caldo conteniendo antibiótico, se le denomina concentración mínima bactericida (MBC) y se define como la mínima concentración de antibiótico que mata al menos el 99.9% del inóculo original (21).

La determinación de la tasa de muerte o curva de muerte se aplica para la evaluación y comparación de nuevos antibióticos y para el estudio de diferencias y cambios en la sensibilidad de las bacterias aisladas clínicamente. Sólo se prueba una

concentración del antimicrobiano, y es aquella que representa el nivel medio sanguíneo durante la terapia. Se prueban diferentes microorganismos contra un antibiótico o varios antimicrobianos contra el mismo microorganismo, luego se determina la disminución en el número de organismos para encontrar el agente bactericida más rápido o para detectar el microorganismo más sensible a la acción bactericida del antibiótico (21).

Estimar directamente la actividad antimicrobiana en el suero del paciente durante el tratamiento, usando como cepa de prueba el microorganismo infectante, teóricamente pueda ser el método más simple y lógico para monitorear el efecto de la quimioterapia en casos complicados. Los agentes antimicrobianos individualmente o en combinación son evaluados en cuanto a su eficacia en el propio sistema del paciente. En un principio Schlichter (22) describió que la determinación de tal actividad antimicrobiana en el suero de los pacientes sólo se utilizaba como una prueba bacteriostática. La determinación de la capacidad bactericida se propuso después, posiblemente por las dificultades en las lecturas del punto final en los tubos conteniendo suero. Esta prueba se utiliza actualmente para monitorear la terapia antimicrobiana en pacientes neutropénicos y con cáncer.

El bioensayo es una prueba basada en la comparación de la

respuesta de un microorganismo sensible a una concentración desconocida del antibiótico con la respuesta del mismo microorganismo a una concentración conocida del mismo. En esencia, un bioensayo es lo contrario a la prueba de sensibilidad de microorganismos estándar, y la respuesta se mide por las técnicas de difusión en agar o dilución en caldo. El bioensayo se realiza utilizando discos de papel filtro que contienen los estándares del antibiótico, así como los problemas. Los discos se colocan en la superficie de agar que contiene disperso el microorganismo indicador. El antimicrobiano difunde radialmente e inhibe el desarrollo del organismo. Las zonas de inhibición producidas por las concentraciones conocidas se grafican contra las concentraciones para trazar una curva estándar. La zona de inhibición producida por los problemas se interpola en la curva patrón y se determina la concentración desconocida (23).

Al efectuar estas pruebas es de gran importancia considerar la fase de crecimiento del inóculo. En la fase logarítmica media los microorganismos mueren más efectivamente, lo contrario ocurre en la fase estacionaria. Se ha demostrado que en la fase logarítmica tardía los organismos mueren menos efectivamente que en la logarítmica media. Por estas razones, los inóculos utilizados deben tener de 4 a 6 horas de incubación en el caso de microorganismos de crecimiento rápido.

# CAPITULO 4



## MATERIAL Y METODOS

### 4.1.- Material

- a) El de rutina en el laboratorio de microbiología.
- b) Placas de microtitulación de fondo redondo.
- c) Microdilutores y micropipetas.
- d) Escala de McFarland.

### 4.2.- Reactivos

- a) Medio para antibióticos No. 5 de Merck.
- b) Infusión cerebro corazón (BHI).
- c) Extracto de levadura.
- d) Peptona de gelatina.
- e) Polianetolsulfonato de sodio (SPS).
- f) Caldo y agar Mueller-Hinton.
- g) Suero y líquido peritoneal de pacientes tratados con pefloxacina.
- h) Suero fresco estéril.
- i) Solución salina isotónica.
- j) Metansulfato de pefloxacina.
- k) Amikacina.

### 4.3.- Cepas

- a) Escherichia coli ATCC 25922
- b) Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

c) Staphylococcus aureus ATCC 25923.

Las cepas utilizadas son sensibles a los siguientes antibióticos: ampicilina, cefalotina, dicloxacilina, eritromicina, lincomicina, penicilina G, cloranfenicol, gentamicina, nitrofurano, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidixico, enoxacina, amikacina, carbenicilina y cefatoxima.

#### 4.4.- Pacientes

Se requirieron pacientes en programa DPCA (diálisis peritoneal continua ambulatoria) que fueron tratados con pefloxacina. Estos pacientes debían cumplir con las siguientes condiciones:

- a) Hombre o mujer no embarazada ni lactando. En quienes se sospeche embarazo o expresen intento de hacerlo durante el curso del tratamiento, no deben ser incluidos en el estudio.
- b) Edad entre 18 y 60 años.
- c) Diagnóstico de falla renal crónica.
- d) Los sujetos no deben tener antecedentes de tratamiento con otro antibiótico por lo menos 72 horas antes de entrar al estudio.
- e) Función hepática normal.

La pefloxacina se administró de la siguiente forma:

- Días 1 y 2: 800 mg pefloxacina en infusión continua con 250 ml de solución glucosada 5% durante una hora.
- Días 3 al 10: 1 tableta de 400 mg por vía oral, una hora

antes del desayuno y de la cena.

Se colectaron muestras de suero y líquido peritoneal los días 1, 3, 5 y 8.

#### 4.5.- Procedimiento

##### 4.5.1. Bioensayo.

###### 1) Preparación de las placas de ensayo.

Las placas se preparan en cajas petri, deben contener una capa base y una capa de agar con el microorganismo indicador. En ambos casos se utilizó agar para antibióticos No. 5 de Merck.

a) En cada caja se adicionan 48 ml de medio base y se distribuye perfectamente en el fondo de la caja.

b) El inóculo se prepara utilizando un cultivo de Escherichia coli en BHI y en incubación por 4 a 5 horas a 35 ° C, posteriormente se ajusta el inóculo al 0.5 de McFarland (5 X 10<sup>7</sup> mos/ml) en SSI estéril y se hace una dilución 1:2. A 100 ml del agar para antibióticos, a 40 ° C, se adiciona 1 ml de la última dilución del microorganismo, se mezcla y se inoculan 12 ml de este medio distribuyéndolo homogéneamente sobre la capa base.

###### 2) Preparación de los discos y realización de la prueba.

En la determinación de las concentraciones adecuadas para trazar la curva estándar de pefloxacina, se utilizaron suero y líquido peritoneal de pacientes en programa de diálisis peritoneal continua ambulatoria que presentaban peritonitis y que

fueron tratados con pefloxacina.

a) Se preparan diluciones de metansulfato de pefloxacina, de tal forma que queden las siguientes concentraciones: 2, 3.7, 6.5, 12 y 22 mcg/ml.

b) Poner discos de papel filtro que cumpla con las especificaciones de la CFR, con lo que se garantiza la adecuada difusión del antibiótico en el medio de cultivo (Origen Schleicher and Schuell, Alemania) (25), e impregnarlos con 20 ml de cada dilución, las concentraciones finales son: 0.04, 0.074, 0.13, 0.24 y 0.44 mcg/disco. Impregnar discos con el mismo volumen de suero y líquido peritoneal de los pacientes en DPCA.

c) En una placa distribuir los discos con las diferentes concentraciones de la curva estándar; asegurarse de que los discos mantengan contacto directo con el agar. Este paso se efectúa cinco veces.

d) En tres placas distribuir los discos problema, así como un disco con la concentración 0.13 mcg (se utiliza esta concentración por ser el punto medio de la curva estándar).

e) Incubar 20 a 24 horas a 35 C.

f) Medir los halos de inhibición y con ayuda de la siguiente ecuación trazar una curva en papel semilogarítmico:

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5$$

$$H = (3e + 2d + c - a) / 5$$

en la que:

L= magnitud de la zona de menor concentración.

H= magnitud de la zona de mayor concentración.

a, b, c, d, e= promedio de la magnitud de las zonas para cada concentración, siendo g la menor concentración.

El promedio de la magnitud de los problemas se interpola en la curva patrón y se determina la concentración del antibiótico en cada caso.

#### 4.5.2 Efecto del polianstol sulfonato de sodio sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Técnica en microplaca

En estas pruebas se utilizan cuatro medios diferentes:

I) BHI

II) BHI + SPS 0.5 g/l

III) BHI + SPS 0.5 g/l + extracto de levadura 5 g/l

IV) BHI + SPS 0.5 g/l + extracto de levadura 5 g/l + peptona de gelatina 12 g/l.

Se utiliza BHI pues es un medio enriquecido en el que desarrollan la mayoría de las bacterias. Se adiciona SPS para determinar el efecto antagonista sobre los antibióticos. El extracto de levadura se utiliza para favorecer el desarrollo de microorganismos que sean exigentes y cuyos requerimientos no sean satisfechos solamente por el BHI. La peptona de gelatina tiene la característica de inhibir la acción del SPS, el cual no permite el desarrollo de bacterias como Neisseria gonorrhoeae y

otros. Todas estas variantes presentan características que pueden permitir el aislamiento de bacterias presentes en los fluidos orgánicos.

La técnica a seguir es la siguiente:

- 1) Se preparan los 4 medios anteriores al doble de la concentración indicada (al hacer la dilución con el inóculo, queda la concentración dada en los datos iniciales).
- 2) Se preparan 2 ml de cada uno de los medios con la concentración más alta del antibiótico que se desea probar.
- 3) En cada placa de microtitulación se prueban dos medios. En los pozos de la columna 1 se colocan 50 mcl del medio con antibiótico (p.ej en los pozos 1A, 1B, 1C y 1D colocar el volumen indicado de BHI más antibiótico).
- 4) En los pozos de las columnas 2 a 7 colocar 25 microlitros del medio correspondientes sin antibiótico.
- 5) Con el microdilutor hacer diluciones de la columna 1 hasta la 5.
- 6) Se utiliza un cultivo incubado por 4 a 5 horas del microorganismo a probar. Posteriormente, se ajusta el inóculo al 0.5 de la escala de McFarland, éste corresponde a la primera fila. Del inóculo ajustado se hacen 3 diluciones: 1:2,  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  (todas a partir del 0.5 McFarland) y pertenecen a las filas 2, 3 y 4 respectivamente. Se inoculan 25 mcl de cada dilución en los pozos de las hileras correspondientes, excepto en los pozos de la columna 7, la cual se utilizará como control de

esterilidad y la columna 6 como control de desarrollo del microorganismo.

7) Incubar 20 a 24 horas a 35 °C.

8) Del ajuste al 0.5 de McFarland hacer cinco diluciones seriadas 1:10 y de la última dilución tomar 0.1 ml y sembrar en agar BHI. Incubar 20 a 24 horas a 35 °C. Este paso se hace por triplicado.

9) En las microplacas se observa desarrollo y ausencia del mismo, en los diferentes medios y concentraciones de antibiótico.

10) Se hacen las cuentas de UFC (unidades formadoras de colonias) en las placas de agar BHI, para conocer el inóculo inicial utilizado.

\*Nota: Todos los pasos del procedimiento se deben efectuar en condiciones de esterilidad. Ver figura No. 1.

#### 4.5.3 Determinación del efecto del polianetolsulfonato de sodio sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC). Técnica en tubo

1) Hacer un subcultivo de microorganismos Escherichia coli en agar Mueller-Hinton, incubar toda la noche a 35 °C.

2) Se inoculan en un tubo, conteniendo 3 ml de caldo Mueller-Hinton (MHB), 5 o más colonias del cultivo anterior hasta alcanzar una turbidez equivalente al no. 1 de la escala de

McFarland.

- 3) Se preparan diluciones seriadas del suero o suero + antibiótico con MHB en un volumen total de 1 ml.
- 4) El inóculo se estandariza al 0.5 de McFarland en SSI o MHB, con lo que habrá  $5 \times 10^7$  mos/ml.
- 5) Diluir el inóculo anterior 1:10 en SSI o MHB. Esto equivale aproximadamente a  $5 \times 10^6$  mos/ml.
- 6) Colocar 0.1 ml del inóculo anterior en los tubos con las diluciones, evitando que entre en contacto con las paredes de los tubos.
- 7) Incubar 24 horas a  $35^\circ\text{C}$ .
- 8) De la dilución 1:10 (punto no. 5), hacer 4 diluciones seriadas 1:10, se tendrá un inóculo de  $5 \times 10^2$  mos/ml.
- 9) Sembrar 0.1 ml de la suspensión final en placas de agar Mueller-Hinton. Este procedimiento se hace por duplicado. Incubar toda la noche a  $35^\circ\text{C}$ .
- 10) En los tubos con las diluciones seriadas determinar MIC.
- 11) Los tubos que no presenten desarrollo visible se agitan en Vortex y se siembra 0.1 ml en placas de agar Mueller-Hinton para determinar MBC. Incubar toda la noche.
- 12) Después de 1 o 2 días, contar el número de colonias por placa. Conociendo el inóculo original, determinar la placa (con la dilución correspondiente) que representa el 0.1% del inóculo original (99.9% en reducción) y esta indica MBC.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2					
B	1,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2					
C	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2					
D	1,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2					
E												
F												
G												
H												

FIGURA No. 1

- 1.- Medio de cultivo con antibiótico.
- 2.- Medio de cultivo sin antibiótico.

Hacer diluciones de 1 hacia 2 consecutivamente hasta la columna No. 5.

- 3.- Adicionar inóculo ajustado al 0.5 de McFarland.
- 4.- Adicionar dilución 1:2 del inóculo al 0.5 de McFarland.
- 5.- Adicionar dilución 10<sub>2</sub> del inóculo al 0.5 de McFarland.
- 6.- Adicionar dilución 10<sub>4</sub> del inóculo al 0.5 de McFarland.

El inóculo de los pasos 3, 4, 5 y 6 se adiciona hasta la columna No. 6.

Las indicaciones antes mencionadas también se aplican a la segunda parte de la tabla.

#### 4.5.4 Curva de muerte

- 1) Se preparan 4 tubos que contengan 10 ml de MHB con la concentración del agente antimicrobiano escogida.
- 2) Colocar un tubo sin antibiótico como control de crecimiento bacteriano.
- 3) Preparar un inóculo, aproximadamente  $5 \times 10^7$  mos/ml, de acuerdo a los pasos 1, 2 y 4 de la prueba de determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC).
- 4) Inocular los tubos de acuerdo al paso 6 de la prueba MIC y MBC. La concentración final debe ser aproximadamente de  $5 \times 10^5$  mos/ml en cada tubo.
- 5) Inmediatamente agitar en Vortex por 15 segundos el tubo correspondiente al tiempo 0 y hacer 3 diluciones seriadas 1:10, tomar 0.1 ml de la última dilución y sembrar en una placa de agar Mueller-Hinton. Hacerlo por duplicado. Incubar 18 a 24 hora a 35 C.
- 6) Efectuar el paso anterior a las 4 horas (diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), 8 horas (diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) y 24 horas (concentrado y  $10^{-1}$ ).
- 7) Graficar en papel semilogarítmico las cuentas de colonias.

# CAPITUL ● 5

## RESULTADOS

### 5.1 Bioensayo

Se determinaron las concentraciones que se deben utilizar para trazar una curva estándar de pefloxacina, en la que se puedan conocer los niveles de dicho antibiótico tanto en suero como en líquido peritoneal de pacientes tratados con el mismo. Las concentraciones encontradas mantienen una proporcionalidad con el halo de inhibición correspondiente, por lo que al conocer el halo de inhibición de los problemas fácilmente se determina la concentración desconocida.

Se encontró que las concentraciones adecuadas para la curva son: 0.04, 0.074, 0.13, 0.24 y 0.44 mcg/disco. Estos resultados graficados se encuentran en la curva no. 1.

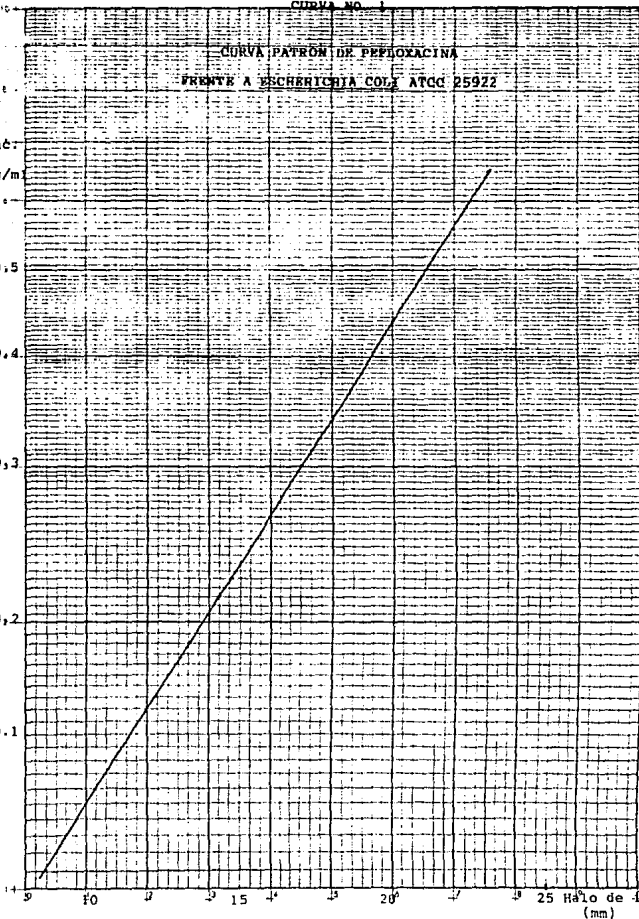
Se trabajó con 3 pacientes, cuyos datos se encuentran tabulados en las tablas 1 y 2:

CURVA NO. 1

CURVA PATRÓN DE PEPLOXACINA  
FRENTE A ESCHERICHIA COLI ATCC 25922

Conc.  
mcg/ml

SEMI-LOGARITMICO (1/10 POR 10 DIVISIONES)



Radio de Inh.  
(mm)

-- Primer día:

Tabla No. 1

Niveles de pefloxacina en suero y liquido peritoneal

<u>No. de paciente</u>	<u>Sexo</u>	<u>Conc. de pefloxacina mcg/ml</u>	
		<u>Suero</u>	<u>L. peritoneal</u>
1	F	--	3.25
2	M	--	1.00
3	M	11.85	10.80

Solamente se obtuvieron muestras del paciente 3 en los días 3o., 5o. y 8o. Los datos son los siguientes:

Tabla No. 2

Niveles de pefloxacina en suero y liquido peritoneal del paciente número 3.

<u>Día</u>	<u>Conc. de pefloxacina mcg/ml</u>	
	<u>Suero</u>	<u>L. peritoneal</u>
3	21.00	20.75
5	12.50	11.85
8	12.50	11.85

5.2 Determinación del efecto del SPS sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC). Técnica en tubo

Estos ensayos se efectuaron en presencia de suero ya que en el organismo la acción del antibiótico se lleva a cabo en un medio altamente proteico por lo que al utilizar el suero se pueden crear condiciones semejantes a aquellas en las que actúa el antimicrobiano en el organismo.

Todas estas pruebas se efectuaron utilizando como microorganismo de ensayo a Escherichia coli ATCC 25922. Los resultados se encuentran reportados en las tablas 3, 4, 5, 6, 7 y

Tabla No. 3

Actividad bactericida de suero humano  
frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

Dilución del suero	Desarrollo
Concentrado	-
1:2	-
1:4	+
1:8	+
1:16	+
1:32	+
1:64	+

El inóculo inicial fué de  $6.2 \times 10^6$  UFC/ml.

La concentración mínima inhibitoria corresponde a la dilución 1:2 y la concentración mínima bactericida, al suero concentrado.



Tabla No. 4

Actividad bactericida de suero humano  
en presencia de polianetol sulfonato de sodio 0.05%  
frente a Escherichia coli AICC 25922

Dilución del suero	Desarrollo
Concentrado	+
1:2	+
1:4	+
1:8	+
1:16	+
1:32	+
1:64	+

El inóculo inicial fué de  $5.7 \times 10^6$  UFC/ml.

Con el fin de conocer el desarrollo bacteriano a las 24 horas, se hizo una cuenta en placa del tubo que contenía suero concentrado y se encontró que había  $7.5 \times 10^9$  UFC/ml.

Tabla No. 5

Actividad bactericida de pefloxacina y suero humano  
frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

Dilución del suero	Pefloxacina (mcg/ml)	Desarrollo
Concentrado	1.0	-
1:2	0.5	-
1:4	0.25	-
1:8	0.12	-
1:16	0.06	-
1:32	0.03	-
1:64	0.015	-
1:128	0.007	+
1:256	0.0035	+

El inóculo fué de  $6.3 \times 10^6$  UFC/ml.

La concentración mínima inhibitoria está determinado por la concentración 0.015 mcg/ml de pefloxacina y la dilución 1:64 del suero. Se encontró que la concentración mínima bactericida corresponde a 0.06 mcg/ml de pefloxacina y la dilución 1:16 del suero, esto es porque se obtuvo una reducción en los microorganismos sobrevivientes de más del 99.9%.

Tabla No. 6

Actividad bactericida de pefloxacina y suero humano  
 en presencia de polianetolulfonato de sodio 0.05%  
 frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

Dilución del suero	Pefloxacina (mcg/ml)	Desarrollo
Concentrado	1.0	-
1:2	0.5	-
1:4	0.25	-
1:8	0.12	-
1:16	0.06	-
1:32	0.03	-
1:64	0.015	-
1:128	0.007	+
1:256	0.0035	+

Inóculo inicial =  $5.8 \times 10^6$  UFC/ml.

La concentración mínima inhibitoria corresponde a la concentración 0.015 mcg/ml de pefloxacina y a la dilución 1:64. La concentración mínima bactericida corresponde a 0.06 mcg/ml de pefloxacina y la dilución del suero 1:16.

Tabla No. 7

Actividad bactericida de amikacina  
frente a Escherichia coli ATCC 25922

Dilución del suero	Amikacina (mcg/ml)	Desarrollo
Concentrado	1.0	-
1:2	0.5	-
1:4	0.25	-
1:8	0.12	+
1:16	0.06	+
1:32	0.03	+
1:64	0.015	+

Inóculo inicial =  $5.5 \times 10^6$  UFC/ml.

La concentración mínima inhibitoria corresponde a 0.25 mcg/ml de amikacina y dil. 1:4 de suero. La concentración mínima bactericida está determinada por 0.5 mcg/ml de amikacina y dil. 1:2 de suero.

Tabla No. 8

**Actividad bactericida de amikacina y suero humano  
en presencia de polianetolsulfonato de sodio 0.05%  
frente a *Escherichia coli* ATCC 25922**

Dilución del suero	Amikacina (mcg/ml)	Desarrollo
Concentrado	1.0	+
1:2	0.5	+
1:4	0.25	+
1:8	0.12	+
1:16	0.06	+
1:32	0.03	+
1:64	0.015	+

Inóculo inicial =  $5.3 \times 10^6$  UFC/ml.

Al no poderse determinar MIC y MBC, se hizo una cuenta viable en el tubo número uno y se encontró que había  $1.49 \times 10^7$  UFC/ml. Se utilizó el tubo no. 1 pues es el que contenía suero concentrado y amikacina 1 mcg/ml y se esperaba que existiera mayor efecto bactericida.

### 5.3 Determinación del efecto del polianetolsulfonato de sodio sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Técnica en microplaca

Inicialmente se probaron los medios BHI, BHI + extracto de levadura y BHI + ext. de lev. + peptona de gelatina adicionados de pefloxacina con Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus; con el fin de determinar si la presencia del extracto de levadura y peptona de gelatina ejercía algún efecto antagonista sobre la acción bactericida de la pefloxacina. Se encontró que en los tres medios el efecto de la pefloxacina se presentaba en la misma forma. Los resultados antes mencionados también se obtuvieron al probar amikacina. Después se probaron los tres medios con los diferentes microorganismos y se observó que desarrollaban igual, es decir la variación en los componentes del medio no afectaba el desarrollo bacteriano.

Utilizando la técnica mencionada en el capítulo anterior se probó la concentración 0.05% de SPS y diferentes concentraciones de pefloxacina con E. coli, P. aeruginosa y S. aureus. Los resultados se encuentran tabulados en las tablas 9, 10 y 11 que marcan tanto las concentraciones del antibiótico como el inóculo utilizado.

Tabla No. 9

Efecto de polianetolsulfonato de sodio 0.05% sobre la acción  
de reflexacina frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

MEDIO	INOCULO (UFC/ml) <sup>4</sup> X 10	CONCENTRACION EN mcg/ml				
		0.25	0.12	0.06	0.03	0.015
I	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	-	+	+
	0.28	-	-	-	+	+
II	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	-	+	+
	0.28	-	-	-	+	+
III	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	+	+	+
	0.28	-	-	+	+	+
IV	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	-	+	+
	0.28	-	-	-	+	+

+ = Crecimiento

- = Inhibición

Tabla No. 10

Efecto de polianetolsulfonato de sodio 0.05% sobre la acción de gatifloxacina frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27953

MEDIO	INOCULO (UFC/ml)	CONCENTRACION EN mcg/ml				
		4.0	2.0	1.0	0.5	0.25
I	5400	-	-	-	+	+
	2700	-	-	-	+	+
	27	-	-	-	-	+
	0.27	-	-	-	-	+
II	5400	-	-	-	+	+
	2700	-	-	-	+	+
	27	-	-	-	-	+
	0.27	-	-	-	-	+
III	5400	-	-	-	+	+
	2700	-	-	-	+	+
	27	-	-	-	-	+
	0.27	-	-	-	-	+
IV	5400	-	-	-	+	+
	2700	-	-	-	+	+
	27	-	-	-	+	+
	0.27	-	-	-	-	+

+ = Crecimiento                      - = Inhibición



Tabla No. 11

Efecto de polianetolsulfonato de sodio 0.05% sobre la acción de rifloxacina frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

MEDIO	INOCULO (UFC/ml)	CONCENTRACION EN mcg/ml				
		1.0	0.5	0.25	0.12	0.06
I	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	-	+	+
	0.28	-	-	-	+	+
II	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	+	+	+
	0.28	-	-	-	+	+
III	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	-	+	+
	0.28	-	-	-	+	+
IV	5700	-	-	+	+	+
	2850	-	-	+	+	+
	28	-	-	-	+	+
	0.28	-	-	-	+	+

+ = Crecimiento

- = Inhibición

Se determinó que los resultados no variaban considerablemente entre los medios II, III y IV, por lo que se decidió probar únicamente los medios I (sin SPS) y IV (con extracto de levadura, peptona de gelatina y SPS). En este caso se probó tanto pefloxacina como amikacina. En la misma prueba se varió la concentración de polianetolsulfonato de sodio y se utilizaron las concentraciones 0.05% y 0.1%. Los resultados se encuentran en las tablas 12, 13, 14, 15, 16 y 17.

Tabla No. 12

Efecto de SPS 0.05% y 0.1% sobre la acción de la pefloxacina  
frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

MEDIO	X 10 <sup>4</sup> INOCULO (UFC/ml)	CONC. EN mcg/ml DE PEFLOXACINA				
		0.25	0.12	0.06	0.03	0.015
I	5800	-	-	-	-	+
	2900	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-
	0.29	-	-	-	-	-
IV SPS 0.05%	5800	-	-	-	+	+
	2900	-	-	-	+	+
	29	-	-	-	+	+
	0.29	-	-	-	-	+
IV SPS 0.1%	5800	-	-	+	+	+
	2900	-	-	+	+	+
	29	-	-	+	+	+
	0.29	-	-	-	+	+

Tabla No. 13

Efecto de SPS 0.05% y 0.1% sobre la acción de amikacina  
frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

MEDIO	X 10 <sup>4</sup> INOCULO (UFC/ml)	CONC. EN mcg/ml DE AMIKACINA				
		1.0	0.5	0.25	0.12	0.06
I	5800	-	-	+	+	+
	2900	-	-	+	+	+
	29	-	-	+	+	+
	0.29	-	-	-	+	+
IV SPS 0.05%	5800	-	+	+	+	+
	2900	-	+	+	+	+
	29	+	+	+	+	+
	0.29	+	+	+	+	+
IV SPS 0.1 %	5800	-	+	+	+	+
	2900	+	+	+	+	+
	29	+	+	+	+	+
	0.29	+	+	+	+	+

Tabla No. 14

Efecto de SPS 0.05% y 0.1% sobre pefloxacina  
frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

MEDIO	INOCULO $\times 10^4$ (UFC/ml)	CONC. EN mcg/ml DE PEFLOXACINA				
		1.0	0.5	0.25	0.12	0.06
I	4800	-	+	+	+	+
	2400	-	+	+	+	+
	24	-	-	+	+	+
	0.24	-	-	-	+	+
IV SPS 0.05%	4800	-	+	+	+	+
	2400	-	+	+	+	+
	24	-	+	+	+	+
	0.24	-	-	-	+	+
IV SPS 0.1%	4800	-	+	+	+	+
	2400	-	+	+	+	+
	24	-	+	+	+	+
	0.24	-	-	+	+	+

Tabla No. 15

Efecto de SPS 0.05% y 0.1% sobre amikacina  
frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

MEDIO	INOCULO $\times 10^4$ (UFC/ml)	CONC. EN mcg/ml DE AMIKACINA				
		1.0	0.5	0.25	0.12	0.06
I	4800	-	-	-	+	+
	2400	-	-	-	+	+
	24	-	-	-	+	+
	0.24	-	-	-	+	+
		4.0	2.0	1.0	0.5	0.25
IV SPS 0.05%	4800	-	-	+	+	+
	2400	-	-	-	+	+
	24	-	-	-	+	+
	0.24	-	-	-	-	+
IV SPS 0.1%	4800	-	+	+	+	+
	2400	-	+	+	+	+
	24	-	-	+	+	+
	0.24	-	-	-	+	+

Tabla No. 16

Efecto de SPS 0.05% y 0.1% sobre pefloxacina  
frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

MEDIO	INOCULO (UFC/ml)	CONC. EN mcg/ml DE PEFLOXACINA				
		1.0	0.5	0.25	0.12	0.06
	X 10 <sup>4</sup>					
I	4500	-	+	+	+	+
	2200	-	+	+	+	+
	22	-	-	+	+	+
	0.22	-	-	-	+	+
IV SPS 0.05%	4500	-	+	+	+	+
	2200	-	-	+	+	+
	22	-	-	+	+	+
	0.22	-	-	-	+	+
IV SPS 0.1%	4500	-	+	+	+	+
	2200	-	-	+	+	+
	22	-	-	+	+	+
	0.22	-	-	-	+	+

Tabla No. 17

Efecto de SPS 0.05% y 0.1% sobre amikacina  
frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

MEDIO	INOCULO (UFC/ml)	CONC. EN mcg/ml DE AMIKACINA				
		4.0	2.0	1.0	0.5	0.25
	X 10 <sup>4</sup>					
I	4500	-	-	-	+	+
	2200	-	-	-	-	+
	22	-	-	-	-	+
	0.22	-	-	-	-	+
IV SPS 0.05%	4500	-	-	+	+	+
	2200	-	-	-	+	+
	22	-	-	-	+	+
	0.22	-	-	-	-	+
IV SPS 0.1%	4500	-	+	+	+	+
	2200	-	+	+	+	+
	22	-	-	+	+	+
	0.22	-	-	-	-	+

#### 5.4 Curva de muerte

En esta prueba se determinaron las diferencias en la tasa de muerte, para lo cual se utilizaron dos diluciones de los antibióticos y del suero, una que presentaba inhibición del desarrollo y otra en la que se observaba desarrollo.

- a) Curva de muerte de pefloxacina más suero frente a Escherichia coli ATCC 25922.  
ATCC 25922

	*Desarrollo -	+
Conc. mcg/ml	0.015	0.0035
Dilución	1:64	1:256
Tiempo (hrs)		
0	$5.8 \times 10^7$ UFC/ml	$6.7 \times 10^7$ UFC/ml
4	--	$7.0 \times 10^6$ UFC/ml
8	--	$2.0 \times 10^6$ UFC/ml
24	--	--

Estos datos corresponden a la gráfica número 2.

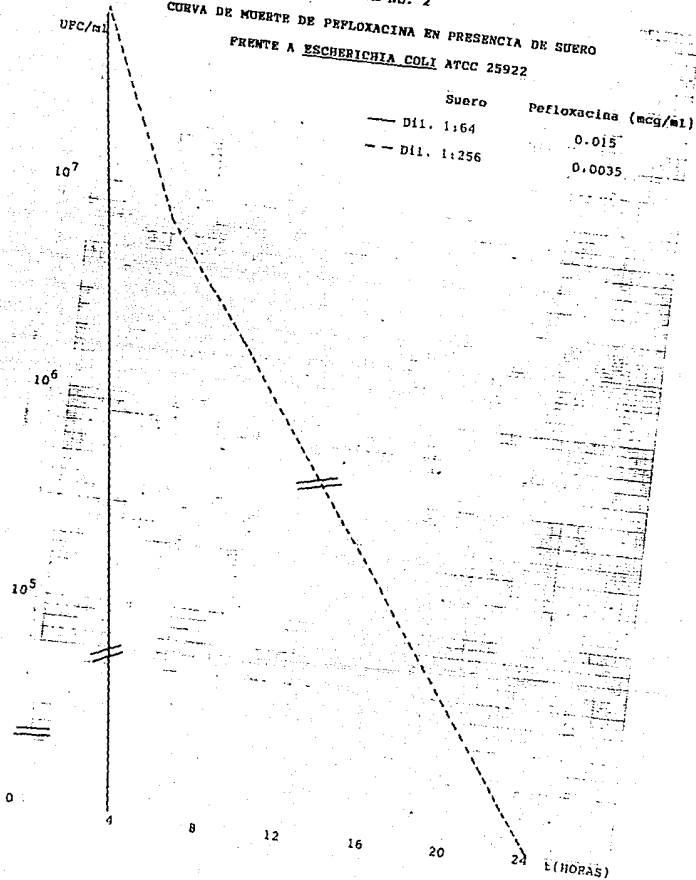
\*

+ = Crecimiento

- = Inhibición

CURVA NO. 2

CURVA DE MUERTE DE PEFLOXACINA EN PRESENCIA DE SUERO  
FRENTE A ESCHERICHIA COLI ATCC 25922



b) Curva de muerte de suero frente a Escherichia coli ATCC 25922.

	*Desarrollo	-	+
Conc. mcg/ml	1.0		0.12
Dilución	Concentrado		1:8
Tiempo (horas)			
0	$5.6 \times 10^7$ UFC/ml		$6.3 \times 10^7$ UFC/ml
4	$2.8 \times 10^6$ UFC/ml		$2.6 \times 10^7$ UFC/ml
8	$7.0 \times 10^4$ UFC/ml		$1.9 \times 10^6$ UFC/ml
24	--		$8.5 \times 10^4$ UFC/ml

Los datos se encuentran graficados en la curva no. 3

c) Curva de muerte de amikacina más suero frente a Escherichia coli ATCC 25922.

	*Desarrollo	-	+
Conc. mcg/ml	0.25		0.06
Dilución	1:4		1:16
Tiempo (horas)			
0	$6.3 \times 10^7$ UFC/ml		$6.8 \times 10^7$ UFC/ml
4	$5.3 \times 10^7$ UFC/ml		$5.8 \times 10^7$ UFC/ml
8	$1.2 \times 10^6$ UFC/ml		$2.5 \times 10^6$ UFC/ml
24	$1.5 \times 10^4$ UFC/ml		$1.1 \times 10^5$ UFC/ml

Estos datos se encuentran graficados en la curva número 4.

\*

+ = Crecimiento

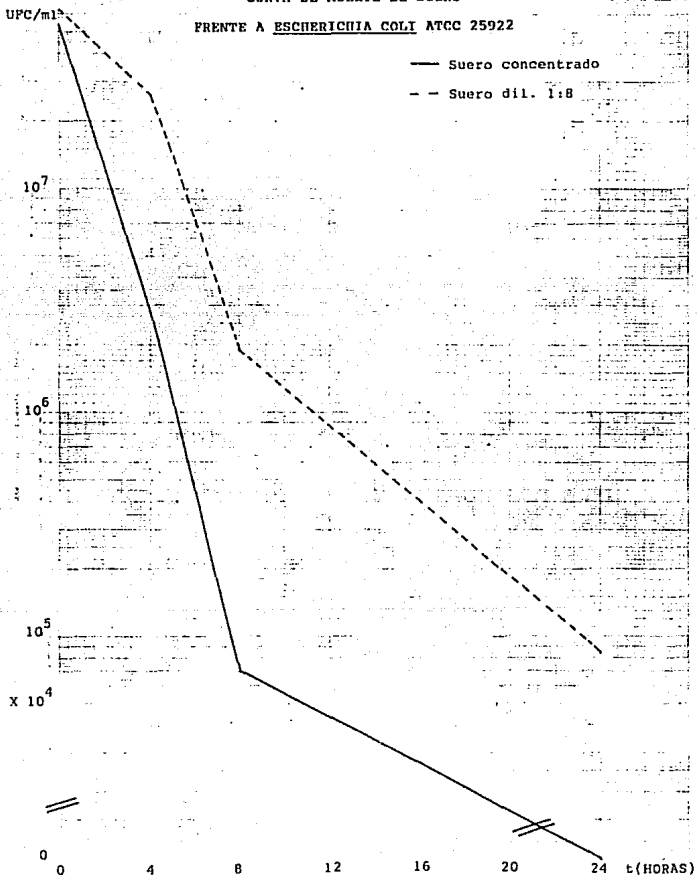
- = Inhibición



CURVA NO. 3

CURVA DE MUERTE DE SUERO

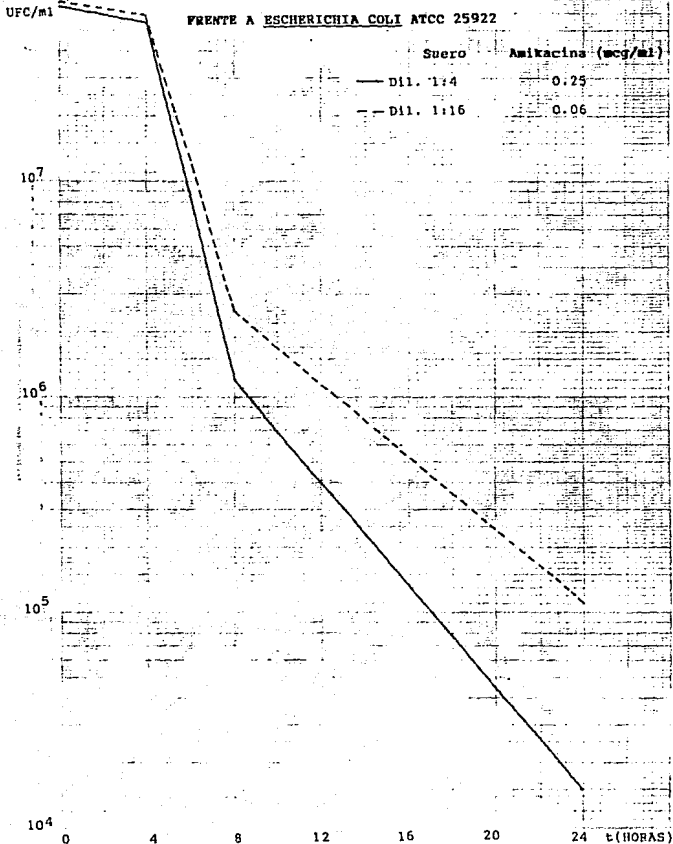
FRENTE A ESCHERICHIA COLI ATCC 25922



CURVA NO. 4

CURVA DE MUERTE DE AMIKACINA EN PRESENCIA DE SUERO

FRENTE A ESCHERICHIA COLI ATCC 25922



# CAPITULO 6

## DISCUSION DE RESULTADOS

Antes de comenzar la discusión de resultados, es de gran importancia mencionar que en un principio la finalidad de este estudio era efectuar la determinación de los niveles de pefloxacina en pacientes que presentarán peritonitis, que estuvieran en programa de diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y que fueran tratados con dicho antibiótico. Se pretendía hacer el seguimiento de los pacientes durante el tratamiento con pefloxacina, de tal forma que se aislara e identificara al microorganismo causante de la infección, se aplicaran pruebas de sensibilidad a la bacteria aislada y finalmente determinar la eficacia de la pefloxacina en la erradicación de este tipo de infecciones bacterianas. En seis meses solo se obtuvieron las muestras completas de un paciente que cumplía con los requerimientos necesarios para entrar en el protocolo de estudio; a estas muestras se les aplicaron las pruebas antes mencionadas.

Para poder efectuar un estudio representativo, es necesario obtener una cantidad mínima de muestras, en este caso solo se pudieron obtener tres muestras en un lapso de seis meses, por lo que se decidió tomar uno de los objetivos secundarios del estudio como punto central del trabajo y alrededor del mismo se realizó la tesis, además de dar el nombre a la misma.

## 6.1 Bioensayo.

Cuando se requiere hacer un ensayo antimicrobiano (23) es necesario incluir los nombres de los antibióticos que recibió el paciente dentro de las 48 horas previas. Esta información es esencial, particularmente cuando se efectuará un bioensayo. En este estudio en las muestras basales obtenidas se detectó la presencia de antibiótico, pero se desconocía de cual se trataba pues en muchas ocasiones los pacientes ingieren algún antibiótico antes de iniciar el tratamiento indicado por el médico, en este caso con pefloxacina de acuerdo con el protocolo descrito.

Al aplicar dosis de pefloxacina (400 mg) por vía oral o intravenosa durante 10 días, se obtienen una concentración máxima en suero de 7.9 a 10 mg/L y 9.6 a 10.1 mg/L respectivamente en pacientes voluntarios sanos (24). El paciente número tres proporcionó la mayor cantidad de muestras. Se determinó que la concentración más alta de pefloxacina se encuentra en las muestras tanto de suero como de líquido peritoneal del 3er. día. Esto se puede explicar porque en el 1o. y 2o. días se administraron dosis de 800 mg por vía intravenosa y se continuó con 400 mg por vía oral. En el 3er. día se mantiene alto el nivel de pefloxacina porque la dosis administrada es alta y a partir del 4o. día comienza a disminuir la dosis por lo que disminuyen los niveles de pefloxacina determinados. Los

resultados obtenidos en suero a partir del 40. día son ligeramente superiores a los mencionados en la bibliografía, esto puede deberse a la técnica utilizada pues la metodología aplicada a las muestras de los pacientes fué una técnica microbiológica y en los datos bibliográficos se utiliza cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ésta técnica es más exacta por lo que existe una pequeña variación con los resultados obtenidos.

Es importante hacer notar que no existen datos reportados con respecto a las concentraciones máximas de pefloxacina alcanzadas en líquido peritoneal (LP). En la curva realizada fué posible interpolar los valores obtenidos de las muestras de suero y LP obtenidas.

#### 6.2 Determinación del efecto del polianetol sulfonato de sodio sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. Técnica en tubo.

Para poder determinar el efecto del SPS sobre la pefloxacina se utilizó la técnica de dilución en tubo. Esta metodología está perfectamente estudiada pues se utiliza para determinar MIC y MBC; durante el ensayo se mantienen constantes el inóculo y el medio de cultivo y la concentración del antibiótico es la variable. Se efectuaron algunas modificaciones a la técnica como adicionar SPS y suero. La principal razón para adicionar suero

es que de esta manera se crea una prueba más real (21); ya que en el organismo la acción del antibiótico se lleva a cabo en un medio altamente protéico por lo que es necesario crear condiciones semejantes a aquéllas en las que actúa el antimicrobiano en el organismo y de esta forma poder determinar cuál es su efecto.

La técnica de dilución en tubo es reproducible siempre y cuando las condiciones en las que se efectúe la prueba no presenten variaciones. Se deben mantener controladas principalmente las siguientes condiciones: fase de crecimiento del microorganismo, los tubos se deben inocular evitando contacto de las bacterias con las paredes de los mismos y al agitar evitar la formación de aerosoles.

Al utilizar una técnica perfectamente estandarizada se pudo determinar el efecto del polianetolsulfonato de sodio sobre el suero, pefloxacina y amikacina, utilizando como microorganismo de prueba a Escherichia coli.

Para iniciar el trabajo, se determinó la actividad bactericida de suero en presencia y ausencia de SPS 0.05%. En presencia de SPS se abatió la acción bactericida del suero y se observó desarrollo bacteriano, con este resultado se comprueba la afirmación hecha por Haerber y Miles (17) acerca de que el SPS tiene una acción anticomplementaria.

Al comparar los resultados de suero + pefloxacina en ausencia y presencia de polianetolsulfonato de sodio 0.05% podemos observar que no hay efecto antagonista del SPS sobre la acción bactericida de la pefloxacina pues en ambos casos se determinó que la pefloxacina actuaba de igual forma sobre los microorganismos, es decir los valores de concentración mínima bactericida (MBC) y MIC se mantuvieron constantes. Es importante mencionar que en estos dos ensayos la acción antibacteriana se atribuye más a la pefloxacina que al suero pues MIC corresponde a 0.015 mcg/ml de pefloxacina y dilución 1:64 de suero y se demostró en la prueba anterior que a ésta dilución, el suero no es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano.

El rango de la concentración mínima inhibitoria para la pefloxacina contra diversas cepas de Escherichia coli reportado en la bibliografía es 0.008-8.0 mcg/ml (24), el valor obtenido de MIC experimentalmente es de 0.015 mcg/ml; se puede decir que la presencia de suero y SPS no altera los valores de MIC.

Al trabajar con suero + amikacina fué posible determinar los valores correspondientes a la MIC y la MBC y para suero + amikacina frente a SPS 0.05% los valores fueron mayores pues el SPS inhibe la acción bactericida tanto de la amikacina como del suero, por lo que se observó desarrollo bacteriano, aún a la concentración más alta probada. El valor de MIC obtenido para suero + amikacina es 0.25 mcg/ml y el rango reportado en la



bibliografía para amikacina contra Escherichia coli es 1.1-16 mcg/ml (24). El valor obtenido experimentalmente es menor al bibliográfico, esto se puede atribuir a la presencia del suero pues al actuar juntos el suero y la amikacina se obtiene un efecto bactericida más grande.

Si se comparan los resultados de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y de la concentración mínima bactericida (MBC) del suero adicionado de pefloxacina o amikacina, podemos observar que en caso de la pefloxacina los valores de MIC y MBC equivalen a una menor concentración del antibiótico, esto se debe a que la actividad bactericida de la pefloxacina no se ve afectada por la presencia de polianetolsulfonato de sodio y su actividad antimicrobiana se mantiene.

### 6.3 Determinación del efecto del polianetolsulfonato de sodio sobre la acción de pefloxacina y amikacina. Técnica en microplaca

Debido a que la técnica de dilución en tubo es un poco difícil de aplicar (hay demasiadas variables que controlar), entonces fué necesario buscar una metodología en la que se pudieran manejar otras condiciones; es decir poder hacer cambios en cuanto al medio de cultivo utilizado, diferentes concentraciones de bacterias y de antibiótico y poder utilizar diferentes microorganismos.

Por lo antes mencionado se diseñó la técnica en microplaca, en la que se probaron tres cepas: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus, así como pefloxacina y amikacina, diferentes concentraciones de polianetolsulfonato de sodio y 4 distintos medios de cultivo. Esta metodología es más rápida, fácil de interpretar, no hay tantas variables que controlar y en una sola microplaca se pueden probar hasta tres medios simultáneamente.

En la literatura se señala que el SPS es un anticoagulante que inhibe la acción de la estreptomina, sulfato de kanamicina, sulfato de gentamicina, amikacina y otros aminoglucósidos (18). En la bibliografía no se reporta cuál es el efecto del SPS sobre los antibióticos de la familia de las 4-quinolonas, en especial sobre la pefloxacina. Se sabe que existe un efecto antagonista del SPS sobre la amikacina, por lo que también se probó éste antibiótico para poder compararlo con un antimicrobiano que es afectado por el SPS y otro sobre el que se desconoce su efecto.

Los antibióticos se comportan de manera variable frente a diferentes microorganismos y por esta razón se probaron tres cepas diferentes.

Para interpretar los resultados, se compara el medio I con cada uno de los medios probados y cuando exista diferencia en un solo punto, se atribuye a la técnica y cuando se presenta variación en 2 o más puntos se puede considerar efecto

antagonista del SPS sobre el antibiótico. Se debe comparar cada uno de los inóculos del medio I con el correspondiente de los otros medios ensayados.

Al probar la pefloxacina como tal y en presencia de SPS 0.05% se encontró que las variaciones en los resultados entre el medio I y los otros medios se atribuyen a la técnica, es decir no se observa un efecto de antagonismo del SPS sobre la pefloxacina. Además no se observaron cambios en el crecimiento bacteriano en los 4 medios utilizados. Por lo anterior se decidió probar únicamente los medios I y IV.

Posteriormente se volvió a probar la concentración 0.05% de SPS, así como 0.1%, con el fin de determinar si existían variaciones en el efecto del polianetosulfonato de sodio sobre los antibióticos al aumentar su concentración. En este ensayo se probó pefloxacina y amikacina.

En el caso Escherichia coli, se observó que hay efecto antagonista sobre la pefloxacina cuando se utiliza SPS 0.05% y este efecto aumentaba al probar SPS al 0.1%. Con amikacina se observó un efecto de antagonismo muy claro a una concentración 0.05% de SPS y no había una diferencia considerable en la concentración 0.1%.

Al probar Pseudomonas aeruginosa se determinó que prácticamente no hay efecto antagonista del SPS sobre la

pefloxacina, pues la inhibición en el desarrollo del microorganismo fue casi la misma en presencia y ausencia del mismo. En presencia de amikacina se observó el efecto antagonista del SPS, aunque se presentó más marcado en la concentración 0.1%. Estos mismos efectos se presentaron en el caso de Staphylococcus aureus.

Si se comparan los resultados anteriores, se observa que solo se presenta efecto inhibitorio del SPS sobre la pefloxacina en el caso de Escherichia coli, se puede decir que depende del microorganismo probado el que se presente o no el efecto antagonista del polianetolsulfonato de sodio sobre pefloxacina.

Al comparar los resultados obtenidos si se prueba amikacina frente a diferentes concentraciones de SPS, se observa que no existe una gran variación entre la concentración 0.05% y 0.1% de SPS, por lo que es preferible seguir utilizando la concentración 0.05% que es la utilizada en los frascos para hemocultivo.

Los resultados obtenidos al probar pefloxacina frente a SPS no fueron reproducibles en su totalidad, por lo que fue necesario recopilar todos los datos obtenidos y concluir sobre los resultados que podrían ser los más precisos.

#### 6.4 Curva de muerte

Anteriormente se mencionó que la curva de muerte es muy utilizada para la evaluación y comparación de nuevos antibióticos

(17). En esta prueba se realizaron curvas de muerte de pefloxacina, amikacina y suero humano.

Al comparar los resultados obtenidos en las tres curvas de muerte, se observa que llegan a cero sobrevivientes la pefloxacina en ambas diluciones probadas y el suero concentrado. En cuanto al tiempo, se determina que la pefloxacina presenta una acción bactericida más rápida que el suero. La amikacina en ninguna de las diluciones probadas llega a cero sobrevivientes, esto se debe a que tiene una actividad bactericida más lenta y menos efectiva.

Es aconsejable que cuando se presenta un proceso infeccioso, éste no se ataque directamente con pefloxacina pues pueden comenzar a aparecer cepas resistentes.

Es importante hacer notar que la pefloxacina en la dilución 1:64, a las 4 horas de incubación ya no se detectó la presencia de microorganismos vivos, lo cual indica que su acción antibacteriana es sumamente rápida.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1.- El bioensayo es un técnica muy útil que ayuda en el seguimiento de pacientes tratados con agentes antimicrobianos, ya que se puede determinar si los niveles terapéuticos del antimicrobiano se han alcanzado en el organismo.

2.- La pefloxacina es un antibiótico de reciente estudio, el cual presenta la característica de tener una actividad bactericida rápida; esto quedó demostrado al efectuar la curva de muerte.

3.- Cuando se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para la pefloxacina, se observó que estos valores están determinados por concentraciones muy bajas del antibiótico, lo cual es de gran beneficio pues las concentraciones plasmáticas son mayores a las que determinan MIC y MBC por lo que la erradicación de las infecciones puede darse rápidamente.

4.- La técnica en microplaca no es totalmente reproducible, pero puede ser útil para obtener resultados tentativos y posteriormente aplicar una metodología estandarizada para comprobar o desechar los resultados de la microplaca.

5.- En la técnica de dilución en tubo se determinó que el polianetolsulfonato de sodio (SPS) no inhibe la acción antibacteriana de la pefloxacina. Si se pretende aislar una cepa bacteriana de algún medio que contenga pefloxacina, no es necesario adicionar SPS. Este trabajo deja la opción abierta para probar otros compuestos y poder determinar cuál de ellos es capaz de inhibir la acción bactericida de la pefloxacina para facilitar el aislamiento de cepas bacterianas de pacientes tratados con dicho antibiótico.

6.- Este trabajo es una muestra de que cuando no se tiene la cooperación de las personas necesarias para realizar una investigación, ésta queda inconclusa y los beneficios que pudieran obtenerse no se alcanzan, por lo que no se presenta un posible beneficio para la sociedad.



## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barlow, A. M. (1963). Nalidixic acid in infections of urinary tract. *Br Me. J.* 2, 1308-1310.
- 2.- Ronald, A. R., Turck, M., and Petersdorf, R. G. (1966). A critical evaluation of nalidixic acid in urinary tract infections. *N. Engl. J. Med.* 275, 1081-1089.
- 3.- Smith JT. The 4-quinolone antibacterials. En Greenwood D, O'Grady F, ed. *The scientific basis of antimicrobial chemotherapy.* Cambridge, Cambridge University Press, 1985; 69-94.
- 4.- Heiby N. Clinical uses of nalidixic acid analogues: the fluorquinolones. *Eur J Clin Microbiol.* 1986 ; 5:138-140.
- 5.- Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 28:581-586.
- 6.- Hussy P, Maass G, Tummier B, Grosse F. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerasa -primase complex, topoisomerases I and II and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob Agent Chemother* 1986; 29:1073-1078.
- 7.- Smith, J. T. (1984). Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *Pharm. J.* 233:299-305.

- 8.- Crumplin, G. C., and Smith, J. T. (1975). Nalidixic acid; an antibacterial paradox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8:251-261
- 9.- Fleming, L. N., Moreland, T. A., Stewart, W. K., and Scott, A. C. (1986). Ciprofloxacin and antiacids. *Lancet.* 2:294.
- 10.- Burman, L. G. (1977). Apparent absence of transferable resistance to nalidixic acid in pathogenic Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:509-516.
- 11.- Elopoulos GM. In vitro activity of new quinolone antimicrobial agents. En: Leive L, ed. *Microbiology.* 1984. Washington DC, American Society for Microbiology. 1986; 219-221.
- 12.- Shimada J. Comparative pharmacokinetics of the new quinolone agents. En: Leive L, ed. *Microbiology.* 1986. Washington DC, American Society for Microbiology. 1986;222-225.
- 13.- Hooper DC, Wolfson JS. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses and toxicities in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:716-721.
- 14.- Toon S, Hopkins D, Rowland M. Enoxacin-warfarin interaction: pharmacokinetic and stereochemical aspects. III World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Abstract 1102, Estocolmo, 1986.

- 15.- Forsgren A, Bergkvist PI. Effect of ciprofloxacin on phagocytosis. Eur J Clin Microbiol 1985; 4:575-578.
- 16.- Jones BM, Geary I, Lee ME, Duerden BI. Activity of pefloxacin and thirteen other antimicrobial agents in vitro against isolates from hospital and genitourinary infections. J Antimicrob Chemother 1986; 17:739-746.
- 17.- Belding ME, Klebanoff SJ. 1972. Effect of sodium polyanetholsulfonate on antimicrobial systems in blood. Applied Microbiology. 24:691-697.
- 18.- Traub WH, Lowrance BL. 1970. Anticomplementary, anticoagulatory, and serum protein activity of sodium polyanetholsulfonate. Applied Microbiology. 20:465-468.
- 19.- Lowrance BL, Traub WH. 1969. Inactivation of the bactericidal activity of human serum by Liquoid (sodium polyanetholsulfonate). Applied Microbiology. 17:839-842.
- 20.- Lennette EH, Balows A, Hausler WJ. Microbiologia Clinica. 3a. edición, Ed. Panamericana. 1982. México. p 545-549.
- 21.- Schoenknacht FD, Sabath D, Thornosberry C. 1985. Susceptibility Test: special tests. p 1000-1008. In EH Lennette, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (ed). Manual of clinical microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology. Washington DC.
- 22.- Schlichter JG, MacLean H. 1977. A method of determining the effective therapeutic level in the treatment of subacute

- bacterial endocarditis with penicillin. Am Heart J. 34: 209-211.
- 23.- Anhalt JP. 1985. Assays for antimicrobial agent in body fluids. p. 1009-1014. In EH Lennette, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (ed). Manual of clinical microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology. Washington DC.
- 24.- Frydman AM, LeRoux Y, Fourtillan JB, et al. 1986. Pharmacokinetics of pefloxacin after repeated intravenous and oral administration (400 mg bid) in young healthy volunteers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 17 (Suppl. B):65-79.
- 25.- Code of Federal Regulation, Title, 21 pags. 300-499. United States Government Printing Office, Washington, D.C. 1980.

# INDICE

## INDICE

	P&g.
INTRODUCCION.....	1
1.- PEFLOXACINA.....	3
Historia.....	3
Mecanismo y blanco de acción.....	6
Actividad antibacteriana.....	9
Interacciones de las 4-quinolonas.....	11
Resistencia.....	14
Farmacocinética.....	15
Efectos adversos y toxicidad.....	17
Aplicaciones de las fluorquinolonas.....	18
2.- POLIANETOLSULFONATO DE SODIO.....	20
3.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.....	24
4.- MATERIAL Y METODOS.....	28
4.1) Material.....	28
4.2) Reactivos.....	28
4.3) Cepas.....	28
4.4) Pacientes.....	29
4.5) Procedimientos.....	30

	Pág.
5.- RESULTADOS.....	38
5.1) Bioensayo.....	38
5.2) Determinación del efecto del SPS sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Determinación de MIC y MBC. Técnica en tubo.....	41
5.3) Determinación del efecto del SPS sobre la acción de la pefloxacina y amikacina. Técnica en microplaca.....	48
5.4) Curva de muerte.....	56
6.- DISCUSION DE RESULTADOS.....	61
7.- CONCLUSIONES.....	71
8.- BIBLIOGRAFIA.....	73