



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DETERMINACION DE PEFLOXACINA EN SUERO
Y LIQUIDO DE DIALISIS PERITONEAL CONTINUA
AMBULATORIA (DPCA) DE PACIENTES CON
INSUFICIENCIA RENAL CRONICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ARACELI GUTIERREZ ESTEVEZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO DISEÑADO POR
DE NUESTRA REPLICACIÓN

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DETERMINACION DE PEFLOXACINA EN SUERO Y LIQUIDO DE DIÁLISIS
PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA (DPCA) DE PACIENTES CON
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA**



M EN C RUBEN DE LA CRUZ GONZALEZ
DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. MARTHA A. SANCHEZ R
ASESOR INTERNO



ARACELI GUTIERREZ ESTEVEZ
SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mis padres por el apoyo brindado a lo largo de toda mi vida, especialmente en la conclusión de una de las etapas más importantes .

Espero no defraudarlos y poder otorgarles los mayores gratificaciones a todos los sacrificios que siempre han realizado. Esto es la mejor herencia que alguien puede recibir y sé que es el comienzo de otra etapa en la cual espero siempre se encuentren a mi lado para disfrutarla juntos.

Al Lic. José Álvarez Prudome por todo el apoyo recibido durante la realización de este trabajo, sin el cual no hubiera sido fácil finalizarlo.

Al M en C Rubén de la Cruz González por su enseñanza y facilidades prestadas durante el proyecto experimental.

A mi asesora Q.F.B. Martha A. Sánchez Rodríguez por todos los conocimientos otorgados para mi formación profesional.

A todas las personas que de alguna forma colaboraron en la elaboración de este proyecto.

Diciembre 1997.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
QUINOLONAS	8
Espectro de actividad	9
Propiedades farmacológicas	11
Farmacocinética	12
Biotransformación	13
Aspectos moleculares	14
Mecanismo de acción	19
Resistencia bacteriana	20
PRUEBAS DE LABORATORIO EN QUIMIOTERAPIA	21
Difusión	24
Dilución	34
PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DIRECTA EN MUESTRA	
CLÍNICA	39
OBJETIVO	41

HIPOTÉISIS	42
MATERIAL Y MÉTODOS	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
METODOLOGÍA	52
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	57
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD	59
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	80

DETERMINACIÓN DE PEFLOXACINA EN SUERO Y LIQUIDO DE DIÁLISIS
PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA (DPCA) DE PACIENTES CON
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.

RESUMEN

Se evaluó la eficacia de la Pefloxacina administrada por vía intraperitoneal a 20 pacientes con peritonitis asociada a Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA), determinándose la concentración en suero y líquido de diálisis en períodos de 12 24 72 240 y 320 hrs , también se aisló e identificó al agente causal del cuadro clínico, asimismo se realizaron pruebas de susceptibilidad a 7 antimicrobianos incluyendo la Pefloxacina.

Las concentraciones de Pefloxacina encontradas en ambos tipos de muestra fueron similares, estas continuaron aumentando e incluso después de la suspensión del tratamiento se encuentran concentraciones de Pefloxacina mayores alas concentraciones mínimas inhibitorias de los microorganismos aislados, los cuales mostraron buena sensibilidad a dicho antimicrobiano.

Algunos síntomas presentes en los pacientes como son vómito, náusea y dolor abdominal disminuyeron después de iniciado el tratamiento.

En base a los resultados obtenidos se puede decir que la Pefloxacina es un antimicrobiano que presenta características aceptables para ser utilizado como tratamiento de elección en infecciones sistémicas.

INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal crónica (IRC) es un síndrome causado por la destrucción progresiva e irreversible de las nefronas sin importar las causas, que conllevan a una serie de alteraciones en la eliminación de productos de desecho metabólico. Esta falta de capacidad de excreción tiene como consecuencia que esos productos sean altamente tóxicos para el organismo y por lo tanto es necesario eliminarlos. En la actualidad se emplean diversos métodos que realizan esta función de eliminación de sustancias tóxicas prolongando así la vida de los pacientes con IRC.

En los últimos tres decenios la diálisis ha llegado a ser una de las formas de tratamiento más efectivas para los pacientes con este síndrome. Uno de los métodos más recientes es la Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA) que tiene como principal ventaja, respecto a los otros métodos de diálisis convencionales, el evitar contar con un equipo especial de diálisis ya que ésta se puede realizar incluso en el hogar del paciente (3).

Sin embargo, con este método surgen algunas complicaciones, tales como la infección al túnel del catéter, peritonitis y pérdida leve de proteínas; por eso la DPCA requiere mucha responsabilidad del paciente y es más

frecuente que se complique con peritonitis, que en la diálisis peritoneal intermitente, debido a las múltiples entradas al sistema. En estudios realizados se ha observado que los microorganismos causantes de peritonitis más frecuentes en este tipo de pacientes son Gram positivos, especialmente Estafilococos; los Gram negativos y hongos son agentes causales con menor frecuencia (17).

Para contrarrestar las infecciones se hace necesario el establecimiento de una antibioterapia adecuada, buscando un antimicrobiano capaz de alcanzar altos niveles tanto en sangre como en líquido peritoneal y así el paciente reciba el tratamiento adecuado en el caso de haberse infectado como consecuencia de la diálisis.

La peritonitis es un proceso inflamatorio localizado o generalizado del peritoneo que puede ser agudo o crónico, puede ser a causa de la entrada de bacterias a la cavidad peritoneal por una perforación en el tubo digestivo o una herida externa penetrante. Por lo general hay dolor y distensión abdominal crecientes, náuseas y vómitos, incapacidad para evacuar o expulsar gases, fiebre, hipotensión, taquicardia, sed y oliguria (17).

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Durante años se buscó un fármaco que tuviera acción directa y selectiva sobre microorganismos infectantes; uno de los precursores de esta búsqueda fue Paul Ehrlich en Alemania, que en 1870 introdujo colorantes que tenían selectividad para componentes celulares. Más adelante él buscó un producto químico sintético que tuviera mayor afinidad por parásitos que por células del huésped y a esta selección le denominó quimioterapia; sólo que estos fármacos eran inactivos en cultivos.

La quimioterapia comienza en 1936, cuando se hace uso de la sulfanilamida. En Alemania, Domagk desarrolló un colorante, el Prontosil, que curaba las infecciones por estreptococos, solo que su actividad " in vitro " era nula; entonces Trefoüel en Francia demostró que pacientes que recibían tratamiento con Prontosil eliminaban un producto metabólico más simple, la sulfanilamida que era efectivo tanto " in vitro " como " in vivo "; creándose así el primer quimioterapéutico para el tratamiento de pacientes infectados. (5).

Debido al éxito obtenido con las sulfamidas se hizo centrar el interés de los investigadores en los antibióticos, que son definidos como sustancias químicas producidas por microorganismos de diversas especies (bacterias, mohos, actinomicetos) que reprimen la proliferación de otros microorganismos (7).

En 1929 Fleming observó que una colonia contaminante del hongo *Penicillium notatum* producía la lisis de las colonias estafilocócicas adyacentes, sin embargo, este agente lítico parecía ser excesivamente inestable para ser utilizado en terapéutica.

En 1939, en Oxford Chain demostró que después de la purificación del material activo, llamada Penicilina, presentaba una actividad extraordinaria frente a ciertas infecciones.

Poco después se alentó la búsqueda de otros antibióticos y en 1944, Waksman en un laboratorio dedicado a la microbiología del suelo, descubrió la estreptomocina de un actinomiceto del suelo. Desde entonces la exploración masiva por parte de las industrias farmacéuticas proporcionó muchos preparados útiles (27).

En 1962, Lescher y cols. descubrieron casualmente el ácido nalidíxico (Fig. 1) cuando se sintetizaba la

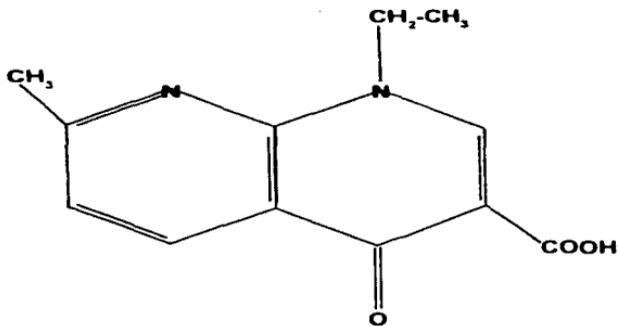


FIG. 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO NALÍDIXICO

REF. N°. 19

cloroquina; este compuesto presentaba una actividad efectiva contra las bacterias Gram negativas. Se observó que al aplicarse se alcanzaba una baja concentración tanto en suero como en tejidos, posiblemente por el tipo de enlace que presenta con las proteínas, lo cual limitó su utilidad en infecciones sistémicas y propició la investigación de derivados del mismo. (24).

En la década de los 70's se realizó el desarrollo de las 4-quinolonas entre las que destacaban, el ácido oxolínico y la cinoxacina que tenían una actividad similar al ácido nalidíxico.

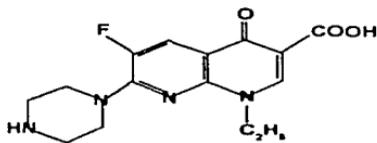
Hasta la década de los 80's fue cuando se dieron a conocer análogos fluorados del ácido nalidíxico, y se observó que debido a esa característica presentaban una mayor gama de ventajas por lo que se propusieron como fármacos de primera elección en varios tipos de infecciones. (7)

QUINOLONAS

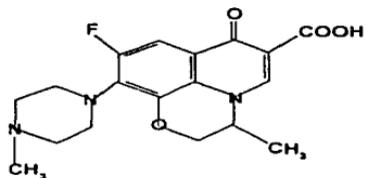
Se denomina quinolonas al grupo de agentes antimicrobianos bioquímicamente relacionados al ácido nalidíxico. Estructuralmente los derivados del ácido nalidíxico comparten un núcleo 4-quinolona y un sustituyente carboxilado en posición 3.

Existe una nueva generación de drogas análogas al ácido nalidíxico, las fluoroquinolonas que poseen propiedades farmacológicas y microbiológicas que las hacen antimicrobianas de primera elección en el tratamiento de infecciones sistémicas y del tracto urinario. (5, 21). Algunas fluoroquinolonas comparten entre sí un átomo de flúor, un anillo de piperacina y un sustituyente carboxilado en la posición 8; pero difieren en los sustituyentes unidos al N de la quinolona. (23). Entre las fluoroquinolonas más importantes que tienen características antimicrobianas similares se encuentran:

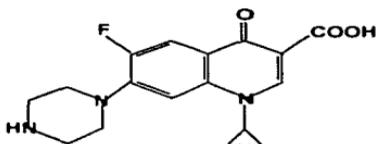
Enoxacina, Ofloxacina, Norfloxacina, Ciprofloxacina y PEFLOXACINA. (Fig. 2).



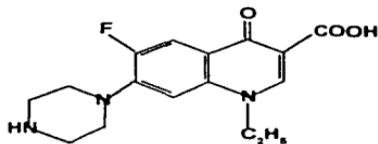
ENOXACINA



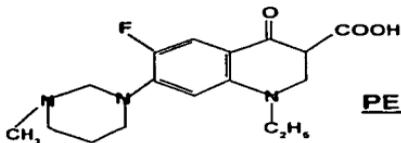
OFLOXACINA



CIPROFLOXACINA



NORFLOXACINA



PEFLOXACINA

FIG. 2 Estructuras químicas de fluoroquinolonas.
Ref. N°. 19.

ESPECTRO DE ACTIVIDAD.

Las fluoroquinolonas poseen un amplio espectro contra bacterias aerobias Gram positivas y Gram negativas a diferencia del ácido nalidixico que posee mayor actividad sólo contra Gram negativas. Sin embargo, las fluoroquinolonas son inactivas contra bacterias anaerobias tales como *Bacteroides fragilis* y *Clostridium difficile* (7, 10).

Entre los organismos sensibles a las fluoroquinolonas se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* y los que son resistentes a los agentes beta-lactámicos y los aminoglucósidos, además de que se necesitan concentraciones pequeñas para lograr el objetivo.

El espectro de actividad incluye también a las enterobacterias que causan infecciones diarreicas, entre las especies susceptibles se encuentran *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas* y bacilos facultativos Gram negativos (19).

Las quinolonas son bactericidas en una concentración de sólo 1 a 4 veces menor a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta actividad se ve reducida por un pH ácido en la orina, iones bivalentes por ejemplo (Mg^{2+}) e inóculo abundante. (19).

Se ha observado que las fluoroquinolonas poseen un amplio espectro contra microorganismos patógenos, que administrados por vía oral logran niveles aceptables en suero y tejidos excediendo la CMI para bacterias susceptibles, además sus reacciones adversas son nulas o mínimas a los preparados farmacológicos (19).

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Se ha observado que las fluoroquinolonas poseen diversas ventajas farmacológicas con respecto a su precursor, ácido nalidíxico. Entre las ventajas más sobresalientes se encuentran:

- Biodisponibilidad después de la administración oral.

- El enlace a proteínas es bajo. por lo que se incrementa la distribución a sitios extravasculares, y tiene una vida media más prolongada en suero lo que permite que se dosifique una o dos veces diariamente.

- El pequeño tamaño molecular de algunas fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, promueve que exista una mejor penetración a los tejidos.

- Se obtienen concentraciones considerables en fagocitos lo que incrementa su eficacia contra microorganismos intracelulares como *Brucella*, *Listeria* y *Mycobacterium*.

FARMACOCINÉTICA

Ha sido estudiada para los diferentes compuestos encontrándose que estos fármacos se absorben fácilmente por todas las vías, incluso el tracto gastrointestinal por lo que se obtiene después de una administración oral el nivel máximo en suero en un lapso de dos horas (23, 19).

Cuando se administran dosis de 400 a 500 mg, el nivel máximo en suero es de 1 a 3 mcg/mL para norfloxacin y ciprofloxacina; 4 mcg/mL para enoxacina; 11 mcg/mL para ofloxacina y PEFLOXACINA es de 8 mcg/mL a las cuatro horas, cuando se ha administrado 800 mg por vía oral. En orina se ha encontrado concentraciones de 100 a 650 mcg/mL y cuando existe falla renal la vida media se incrementa (6, 19, 23).

BIOTRANSFORMACIÓN

La biotransformación de las quinolonas difiere entre ellas, norfloxacin y ciprofloxacina produce hasta seis metabolitos, algunos de ellos presentan actividad antibacteriana, en cambio ofloxacina apenas se metaboliza (19).

La excreción se realiza principalmente por riñón; la eliminación activa es del 98% para ofloxacina, 50% para ciprofloxacina y entre el 30% y 40% para PEFLOXACINA; además de que esta concentración es de 100 veces mayor al nivel sérico. La ciprofloxacina y norfloxacin son excretadas no sólo por riñón sino también por hígado.

La excreción renal ocurre tanto por filtración glomerular y por secreción tubular activa.

La vida media de las fluoroquinolonas fluctúa entre 3 y 8 hrs para norfloxacin y ciprofloxacina, dependiendo el preparado; de 6 a 7 hrs para enoxacin y ofloxacina y hasta 8 hrs para PEFLOXACINA (19, 7)

ASPECTOS MOLECULARES

En la célula bacteriana existe una sola molécula continua de ácido desoxirribonucleico (DNA) que forma el cromosoma. Esta molécula mide aproximadamente 1mm. de longitud, peso molecular de 3×10^9 daltons y es un círculo cerrado.

La estructura molecular fue determinada por los trabajos de Watson y Crick consiste en una doble hélice formada por dos tiras de polinucleótidos complementarios, en cada una de las cuales las bases de purina y pirimidina están dispuestas a lo largo de un esqueleto de grupos alternantes de desoxirribosa y fosfato; las tiras complementarias están unidas por puentes de hidrógeno entre bases adyacentes; una purina y una pirimidina, los enlaces son A-T y G-C.

A=Adenina

G=Guanina

T=Timina

C=Citosina

La presencia de las cadenas complementarias permiten la fiel replicación del cromosoma durante la división (28).

En las células procarióticas, eucarióticas y en los virus se ha demostrado que el DNA se replica de acuerdo con el mecanismo semiconservador en donde las tiras complementarias se separan y cada una sirve como plantilla sobre la cual se ensambla una nueva tira complementaria por la polimerización enzimática de subunidades de nucleótidos (28).

En consecuencia la replicación lleva la formación de dos nuevas hélices dobles; cada una idéntica, a la doble hélice original. A 37°C la replicación se produce a una velocidad de 750 pares de bases/seg./horquilla de replicación. Para que una célula hija reciba una copia del cromosoma en la división celular, debe existir algún control sobre la replicación del cromosoma. Se ha supuesto que existe un punto el cual se adhiere a la membrana celular para que la replicación se pueda sincronizar con la división celular. Jacobo y Brenner (1963) proponen un modelo al cual denominaron " modelo de replicación ", en donde se propone un punto específico del cromosoma que es activado por una proteína " iniciadora ", se inicia la replicación a ese punto y luego prosigue en forma bidireccional hasta que todo el cromosoma ha sido replicado (28).

Se requiere tres clases de proteínas para la replicación correcta del cromosoma bacteriano:

- Proteínas de iniciación (entre ellas girasa y RNA polimerasa) éstas dirigen la iniciación para el origen de la replicación, además el ensamblaje del complejo en el origen.

- Proteínas específicas (entre ellas topoisomerasa I y Rnasa r) que suprimen la iniciación en otros sitios.

- Proteínas de replicación (primasa y holoenzima de la polimerasa III del DNA), que ceban y alargan las cadenas de polinucléotidos. Se requieren para el control alrededor de 13 o más proteínas. (28).

Las topoisomerasas son enzimas de gran importancia para la replicación del cromosoma procariótico, controlan la densidad superhelicoidal de las moléculas de DNA alterando el número de uniones, se clasifican de acuerdo a su capacidad para catalizar roturas en una o en las dos cadenas de molécula de DNA.

Topoisomerasas de tipo I. Producen roturas en cadenas únicas, también se le denomina proteína W y esta codificada por top A en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, esta es capaz de relajar el superenrollamiento de un sólo paso pero no

introduce giros superhelicoidales. Se ha observado que no es necesaria para la viabilidad de bacterias como *E. coli*.

Topoisomerasa de tipo II o DNA girasa. La topoisomerasa II lleva a cabo la función de la topoisomerasa I, pero además es capaz de catalizar la formación de superhélices negativas.

La DNA girasa de *E. coli* es oligomérica o está compuesta por dos subunidades alfa y dos subunidades beta. Las subunidades alfa y beta son, respectivamente producto de los genes *gyr A* (*Nal A*) y *gyr B* (*Cov*).

Esta enzima produce ruptura en las dos cadenas de la molécula; su forma de acción es modificando el número de uniones del DNA por una alteración transitoria del enrollamiento de la molécula. Esto ocurre por la estabilización simultánea de un enrollamiento positivo y negativo; entonces la enzima produce una ruptura de doble cadena en uno de los nódulos sobre enrollado para permitir el pasaje del segmento no roto de la doble cadena. La DNA girasa hidroliza ATP en el curso de su acción. Esta actividad está asociada con la subunidad beta y probablemente sea necesaria para los cambios configuracionales que permiten el reacomodamiento de la estructura superhelicoidal. (4).

También se ha observado que el ácido nalidíxico y sus análogos tiene efecto determinante sobre el gen *gyr A* de la subunidad alfa por lo que se inactiva la enzima, y por lo tanto se detiene la replicación, siendo letal para la bacteria (19).

MECANISMO DE ACCIÓN

Se ha demostrado que el mecanismo fundamental de la acción antibacteriana de estos compuestos consiste en la inhibición de la síntesis del DNA impidiendo su replicación, esto es mediante la inhibición de la DNA girasa bacteriana, una enzima que corta y sella el DNA en el proceso de transcripción por lo que reduce el tamaño del DNA por superenrollamiento (3). Esto ha sido comprobado " in vitro " en cultivos de *E. coli* . De esta forma, al interrumpirse la replicación del cromosoma, el crecimiento bacteriano queda inhibido hasta llegar a la acción letal (2, 9, 25, 28).

RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana a las quinolonas es poco frecuente, se da principalmente por mutaciones, lo que causa que se reduzca la afinidad de la DNA girasa hacia las quinolonas y que se disminuya la permeabilidad de la pared celular bacteriana a las quinolonas. La resistencia mediada por plásmidos no ocurre. (12, 22).

PRUEBAS DE LABORATORIO EN QUIMIOTERAPIA

Un sinnúmero de consideraciones están involucradas en la selección de un antimicrobiano apropiado para tratar una infección. Estas incluyen : i) conocimiento de la susceptibilidad " in vitro " inherente del organismo infectante a antimicrobianos apropiados. ii) La relación de la susceptibilidad de la cepa con otros miembros de la misma especie. iii) Propiedades farmacológicas incluyendo toxicidad, enlace a proteínas, distribución, absorción y excreción particularmente bajo circunstancias de existencia o desarrollo de falla hepática o renal. iv) Previas experiencias clínicas de la eficacia en el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por las mismas especies. v) La naturaleza de la procedencia del proceso patológico, esto es la historia natural y su influencia quimioterápica y vi) el estado inmune del paciente.

De estos factores las concentraciones de antimicrobianos requeridos para inhibir o matar organismos " in vitro " y aquellos involucrados en fluidos corporales durante el tratamiento están sujetos a medición directa en el laboratorio clínico.

Cuando se selecciona un agente antimicrobiano para terapia es responsabilidad del médico tomar en cuenta las características farmacológicas de varios fármacos así como también su relativa eficiencia antimicrobiana. La responsabilidad del laboratorio es proporcionar información por medio de pruebas " in vitro " de la actividad de agentes antimicrobianos apropiados contra el organismo en cuestión.

Las pruebas utilizadas para medir la susceptibilidad bacteriana a determinados antimicrobianos son Difusión y Dilución en agar, de manera general.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad difusión y dilución pueden estar influidos marcadamente por los reactivos y condiciones de las pruebas, siendo éstas variables el origen de una confusión considerable en el pasado. La densidad del inóculo es especialmente importante, también el tiempo y la temperatura de incubación, pH, atmósfera y estabilidad de los antimicrobianos, todas pueden influir el punto final obteniendo diferencias en el medio, entre uno y otro lote puede influir los resultados de las pruebas, particularmente con las sulfonamidas, tetraciclinas, polimixinas y aminoglucósidos. Por dichas razones se ha hecho especial énfasis en los procedimientos de referencia y estandarización metodológica debido a que sólo

de está manera se obtendrá la reproducibilidad adecuada en el trabajo de investigación y clínico.

En cada una de las pruebas de susceptibilidad, el inóculo se deriva de varias colonias. Esto está diseñado para reducir la probabilidad de seleccionar variantes derivadas de mutaciones (ejem. pérdida en la producción de penicilinas en *Staphylococcus*) o segregantes de factor R marcador de resistencia. Además esto incrementa la probabilidad de incluir representantes del organismo más resistente, si más de una cepa es representada por colonias que no pueden ser distinguidas morfológicamente. El inóculo final es razonablemente pesado, el cual incrementa la posibilidad de detectar mutaciones de alta frecuencia en cepas resistentes y heterorresistentes. El medio seleccionado muestra generalmente buenas cualidades amortiguadoras, reproducibilidad y de pH fisiológico. Un criterio central de las condiciones para ser usado en una difusión efectiva, dilución o pruebas automatizadas es que debe ser capaz de detectar cepas que lleven determinantes resistentes de importancia clínica.

DIFUSIÓN:

Método aceptado por la FDA (Food Drugs Administration) y como estándar por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Este procedimiento como es usado normalmente es una prueba esencialmente cualitativa la cual define la sensibilidad o resistencia de organismos frente a determinados antimicrobianos.

La susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos puede ser medida " in vitro " utilizando los principios de difusión en agar. Razonablemente la exactitud y precisión de los resultados puede obtenerse con técnicas de difusión en agar, procurando que todos los detalles del procedimiento sean cuidadosamente controlados y estandarizados. Las técnicas de difusión pueden ser utilizadas como procedimientos cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos, pero generalmente los microorganismos son clasificados como susceptible, intermedio o resistente para cada antimicrobiano.

Los antimicrobianos son comúnmente aplicados en placas de prueba en discos de papel filtro secos. Cuando un disco es aplicado a la superficie inoculada del medio de prueba, ocurren varios eventos simultáneamente: Primero, el disco seco absorbe agua del medio de agar disolviendo así al fármaco. El antimicrobiano es entonces liberado para migrar a

través del medio de agar adyacente, siguiendo las leyes físicas que rigen la difusión de moléculas a través de un gel agar. El resultado final es un intercambio gradual, del gradiente de concentraciones del fármaco en el agar que rodea a cada disco. Así como la difusión del antimicrobiano progresa, también se inicia la multiplicación bacteriana. Después de una fase inicial "log", se inicia la fase de crecimiento logarítmica. En este punto la multiplicación bacteriana procede más rápidamente que lo que la droga puede difundir, una célula bacteriana la cual no es inhibida por el antimicrobiano continúa multiplicándose bajo las leyes de crecimiento. (FIG. 3).

La ausencia de crecimiento aparecerá en el área donde la droga se presente en concentraciones inhibitorias. La posición de la zona de inhibición de la mayoría de los antimicrobianos y microorganismos es determinada durante las primeras horas de incubación (fase " log plus " 2 ó 3 generaciones). Obviamente los microorganismos con crecimiento prolongado parecerán ser más susceptibles a cada antimicrobiano porque el fármaco tendrá más tiempo para difundir antes que la posición de la zona sea determinada. Los procedimientos de difusión han sido estandarizados para ser probados con bacterias patógenas de rápido crecimiento como son miembros de la familia Enterobacteriaceae y *S. aureus* los cuales demostraron ser consistentes y tener velocidad de crecimiento predecibles cuando son probadas

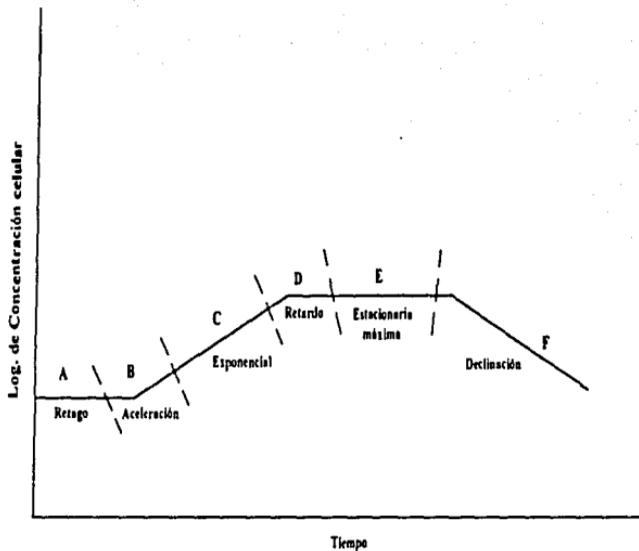


FIG. 3 Curva de Crecimiento Celular
Jawetz, Microbiología Médica, 1987.

bajo condiciones estandarizadas. Los microorganismos que muestran marcada variabilidad especie a especie en su razón de crecimiento no pueden ser probadas por los procedimientos de difusión estandarizados.

El tamaño de la zona de inhibición es también afectado por la velocidad de difusión del fármaco através del gel agar; diferentes fármacos difunden en diferentes velocidades. Por consecuencia las zonas observadas con un fármaco no pueden ser comparadas con aquellas obtenidas con algún otro antimicrobiano. Sin embargo el diámetro de la zona de inhibición es inversamente proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI) cuando es medida por un método de dilución.

Para las pruebas de susceptibilidad por difusión en agar, el antimicrobiano en el disco debe ser estandarizado. En USA solamente una potencia en el disco es recomendada para cada antimicrobiano. El disco más apropiado contiene la cantidad suficiente de antimicrobiano para producir zonas de no menos de 10 mm de diámetro con todas las especies las cuales son inhibidas por la concentración más alta que pudiera ser de mayor interés clínico. De otra manera el disco pudiera no ser potente y las especies susceptibles darían grandes zonas de inhibición inutilizables (en la mayoría de los casos menor de 30 mm raramente mayor de 40mm).

La prueba de difusión de disco comúnmente recomendada por la U.S. Food and Drug Administration y por el NCCLS es una ligera modificación a la descrita por Bauer et al.

Se utiliza agar Mueller-Hinton. El medio no suplementado es un soporte en el crecimiento de la mayoría de los microorganismos para los cuales las pruebas de susceptibilidad son importantes. Otros microorganismos podrían requerir la adición de 5% de sangre defibrinada de carnero, caballo o algún otro animal.

Debido a que hay algunas variaciones de lote a lote en el funcionamiento del agar Mueller-Hinton, cada nuevo lote deberá ser probado con las cepas control antes de ser descargado para su uso en pruebas de identificación clínica. El pH de cada lote de agar será chequeado al tiempo que el medio es vertido para su uso. El pH será de 7.2 a 7.4 después del equilibrio a una temperatura ambiente y se medirá permitiendo al agar solidificar alrededor de los electrodos de un potenciómetro, por maceración del medio en agua destilada neutra o por el uso de un electrodo de superficie.

El medio recién preparado y enfriado es vertido en cajas petri en una superficie horizontal a modo de dar uniformidad y profundidad de 4 mm aproximadamente; esto requiere aproximadamente 60 mL del medio en placas de 150 mm y aproximadamente 25 mL en placas de 100 mm de diámetro.

Después que el medio se ha dejado solidificar a temperatura ambiente, serán almacenadas en un refrigerador (2 a 8°C). Las placas serán envueltas en plástico para minimizar la evaporación, especialmente si son almacenados por más de 7 días. Justo antes de usar las placas deberán ser colocadas en la incubadora (35°C) con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad en la superficie se pierda por evaporación (normalmente cerca de 10 a 20 minutos).

Los cartuchos de antimicrobiano contenido en discos de papel filtro certificado especialmente para pruebas de susceptibilidad son generalmente suministrados en contenedores separados, cada uno con un desecante. Estos deben almacenarse en refrigeración (2 a 8°C) o a -14°C o menos hasta donde se necesite.

Los discos que contienen fármacos las cuales corresponden a las familias de penicilinas o cefalosporinas serán mantenidas siempre en congelación para asegurar el mantenimiento de su potencia. Para abrir los contenedores, deberán ser sacados del refrigerador o congelador 1 o 2 hrs antes, los discos son usados y llevados al equilibrio a temperatura ambiente antes de ser abiertos. Esto se hace para minimizar la cantidad de condensación, que pudiera originarse cuando el aire caliente del ambiente llega a los contenedores fríos.

Las placas de pruebas pueden ser inoculadas por un método estándar o por método de agar extendido. En ambos métodos de inoculación, dentro de 15 min. después de ser inoculadas las placas son aplicados los discos con antimicrobiano a la superficie de las placas inoculadas, con un dispensador mecánico o manual con pinzas estériles. Todos los discos deben ser presionados suavemente hacia abajo sobre el agar con pinzas o con la aguja inoculadora para asegurar el contacto completo con la superficie del agar.

Los discos se disponen de tal forma que no estén tan cerca entre ellos, a 15 mm de los bordes de la placa y lo suficientemente lejanos para prevenir un traslapamiento de zonas de inhibición.

Generalmente los límites en el número de discos que pueden ser colocados en una placa sencilla de 150 mm es de 12 o 13 y de 4 a 5 en una de 100 mm.

Después de 15 min. en que son aplicados los discos, las placas se invierten y son colocadas en una incubadora a -- 35°C. De permanecer mayor tiempo antes de la incubación, permitirá un exceso de predifusión del antimicrobiano. La incubación en un ambiente de CO₂ incrementado debe evitarse ya que el CO₂ alteraría el pH de la superficie lo suficiente para afectar la actividad antimicrobiana de algunos agentes.

Después de 16 a 18 hrs de incubación los halos son medidos y aproximados al mm entero próximo, usar escala calibrada , una regla o Vernier. Cuando el medio usado no es suplementado el aparato para medir se sostiene en la parte de atrás de la placa, la cual es iluminada con luz reflejada contra un fondo negro no reflejante. Las zonas en medio que contiene sangre son medidas en la superficie del agar. El punto final para toda lectura es la completa inhibición del crecimiento, pasando por alto colonias diminutas las cuales pueden ser detectadas por un escrutinio minucioso o por el uso de luz transmitida o aumentos mecánicos. El crecimiento de colonias grandes de la zona clara de inhibición podría representar variantes resistentes o mezcla de inóculo podría requerir reidentificación y ser probadas otra vez.

En el caso de sulfonamidas o mezclas trimetoprim-sulfonamida, los microorganismos podrían crecer a través de varias generaciones antes de que ocurra la inhibición. En este caso, ligero crecimiento (80% de inhibición) es pasado por alto, y se mide al margen del crecimiento abundante.

El swarming de *Proteus sp.* es también pasado por alto y se mide al margen del crecimiento abundante. En situaciones de urgencia clínica, las lecturas preliminares se obtienen casi siempre 5 o 6 hrs después de la inoculación, pero las placas volverán a incubarse y el reporte final es hasta las 16 o 18 hrs de incubación.

Los diámetros de las zonas de inhibición de los antimicrobianos individuales son ordenados en susceptible, intermedio o resistente, categorías referidas en tablas de interpretación. (9, 14)

VENTAJAS:

•El procedimiento es flexible en cuanto a los antimicrobianos que pueden ser probados y es fácil de poner en pruebas individuales en diferentes tiempos. Esto es técnicamente simple, sin embargo requiere una atención cuidadosa y detallada.

•Es generalmente aplicable a organismos que crecen en proporciones aproximadas, aquellos miembros de la familia Enterobacteriaceae y *S. aureus*.

•El procedimiento ha sido adaptado para detectar cepas productoras de penicilinas de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* y cepas de neumococos que han desarrollado una resistencia incrementada a penicilina y algunos otros antibióticos.

•En casos de urgencia clínica pueden servir como inoculo la muestra clínica siguiendo las precauciones debidas.

DESVENTAJAS:

•Interpretación no cuantitativa.

•Inaplicabilidad a muchos organismos de lento crecimiento y anaerobios.

•Inexacto en predecir la susceptibilidad (como oposición a resistencia) con ciertos antimicrobianos por ejemplo Polimixinas que difunden lentamente.

•Es un procedimiento efectivo para la mayoría de las pruebas de rutina pero requiere suplementación con una prueba de dilución en situaciones en que es inaplicable o se requieren resultados cuantitativos. (9).

•Las precauciones especiales que deben ser tomadas y en especial la interpretación de estándares que deben ser usados para probar *N. meningitidis* contra las sulfonamidas.

•La prueba de difusión de disco no se ha hecho con ningún mandelato de metenamina o hipurato de metenamina, por no tener comportamiento regular entre las condiciones " in vivo " e " in vitro " .

Los problemas especiales son con especies de *S. aureus* heterorresistentes, " meticilina resistentes " . Estas cepas parecen tener un aumento de resistencia clínica a las penicilinas y cefalosporinas. Estas pueden detectarse con discos de meticilina , oxacilina, o nafcilina y a temperatura de 35°C no a 37°C. Las pruebas de difusión con estas cepas casi siempre fallan indicando resistencia a cloxacilina y cefalotina. Sin embargo, las cepas resistentes a meticilina, oxacilina o nafcilina podrán ser considerados potencialmente resistentes a penicilinas y cefalosporinas, y se debe tener cuidado clínico en este caso.

DILUCIÓN:

Uno de los métodos cuantitativos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es el de dilución, el cual es derivado de recomendaciones de Estudio Colaborativo Internacional o del propuesto por la NCCLS.

Las pruebas de dilución son usadas para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antimicrobiano para inhibir o matar un microorganismo. Diluciones seriadas del antimicrobiano son inoculadas con el organismo e incubadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la más baja concentración a la que se detecta crecimiento visible.

Para la mayoría de los propósitos, una concentración de 128 mcg/mL es un límite superior satisfactorio para pruebas de rutina con un antimicrobiano. Excepciones importantes son pruebas con carbenicilina con la cual la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 100 a 128 mcg/mL es considerada como susceptibilidad significativa a los niveles alcanzados en sangre y pruebas en quienes los resultados son relacionados a concentraciones de agentes excretados por esta ruta. En otros casos, tales como pruebas de macrólidos y lincomicinas, límites superiores de 32 mcg/mL son adecuados. La más baja concentración seleccionada para prueba de dilución de rutina variará de acuerdo al

antimicrobiano. En general, sin embargo esta concentración podría ser inferior al límite superior de alto grado de susceptibilidad, inhibición por la cual es la probable respuesta " in vivo ", cuando las infecciones sistémicas van de leves a moderadamente severas, son tratadas con la dosis usual. El rango de concentraciones incluirá el punto final de las cepas estándar apropiadas para permitir un control adecuado.

Las diluciones de antimicrobianos son preparadas de soluciones " stock " en 10 veces mayores de las concentraciones requeridas en la prueba final. Los esquemas de dilución, serán seleccionados incluyendo una concentración de 1 mcg/mL o 1 UI/mL para permitir comparación de resultados de diferentes laboratorios y su fácil expresión como log 2, lo cual facilita la manipulación estadística.

En las bases de rutina, es posible reducir el número de concentraciones probadas a unas pocas correspondientes a niveles fácilmente alcanzados en sangre y orina después de la administración de varios regímenes de dosificación de cada uno de los agentes antimicrobianos.

Para bacterias de crecimiento rápido aeróbico y anaeróbicas facultativas, se recomienda usar el agar Mueller-Hinton, este medio soporta el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas, sin embargo la suplementación con 5%

de sangre desfibrinada de carnero, caballo u otro animal puede ser necesaria para asegurar el crecimiento de organismos más exigentes. La suplementación con sangre del agar Mueller-Hinton tiene poco efecto en el punto final de la prueba de susceptibilidad al antibiótico, excepto en el caso de agentes con gran capacidad de enlazarse a proteínas, tales como la Novobiocina, la actividad de las sulfonamidas y trimetoprim es parcialmente antagonizada por todas las sangres a excepción de la de caballo linada.

Las cantidades apropiadas de medio (placas de 100 mm requieren 25 ml. de agar) son colocadas en contenedores con tapón de rosca y autoclavados; se lleva el medio al equilibrio a una temperatura constante en un baño a 50°C. La adición del agente antimicrobiano al agar a temperaturas mayores puede provocar la deterioración de este, la adición a temperaturas más bajas evitará una mezcla adecuada.

Para trabajos de referencia, un volumen de cada dilución de antimicrobiano se adiciona a cada 9 volúmenes de agar. Por ejemplo una concentración final de agar de 126 mcg/mL es obtenida por adición de 10 mL de solución a 1,280 mcg a 90 mL de agar.

El inóculo se prepara con 4 o 5 colonias aisladas representativas de los organismos a ser probados e inoculadas en 4 o 5 mL de caldo adecuado, (tal como caldo soya

tripticasa) y ajustado a la turbidez del estándar 0.5 de sulfato de Bario (escala de Mc Farlan) esta turbidez es equivalente a aproximadamente: 5×10^7 UFC/mL para Enterobacteriaceae y 1×10^8 a 5×10^8 UFC/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Se prepara una solución salina o caldo Mueller-Hinton. La inoculación de las placas deberá hacerse dentro de los 30 minutos siguientes de haber sido ajustado el inculo. La superficie de las placas que contienen las diluciones de antimicrobianos y la placa de control que no contiene antimicrobianos se inoculan en "gota" (sin extender) con una asa calibrada para depositar 0.001 a 0.002 mL (1 a 2 µL) o con el aparato de replicación de inculo de Steers. En cada caso unas 10^4 UFC llegan a una gota de 5 a 8 mm. de diámetro. El replicador de Steers puede adquirirse con una cabeza de aluminio que lleva 32 (para placas de petri redondas de 100 mm.) o 36 (para placas cuadradas de 100 mm.) inoculadores a intervalos regulares. Las cabezas de acero inoxidable son más fácil de limpiar y están menos sujetas a la corrosión.

Cuando se usa el replicador de Steers, una parte de la suspensión en caldo ajustada se lleva con pipeta a la concavidad correspondiente de la placa de siembra y luego los inoculos se recogen y se transfieren suavemente a la superficie del agar con el replicador para evitar las

salpicaduras. Las placas que contienen la menor concentración deben sembrarse primero, aunque la transferencia de cantidades significativas de antimicrobiano nuevamente a las concavidades no parece producirse.

En la practica común pueden probarse hasta seis antimicrobianos sin cambiar la cabeza del replicador. Las placas de control deben sembrarse en último término para asegurar que hubo microorganismos viables en todo el procedimiento.

Las placas de agar inoculadas se dejan reposar sin tocarlas hasta que las gotas de inóculo estén completamente absorbidas y luego se incuban a 35°C durante 16 a 20 hrs.

Las pruebas de susceptibilidad directa serán estrictas para fluidos corporales normalmente estériles o caldo de cultivo de tales fluidos cuando el examen microscópico sugiera la presencia de un simple organismo y cuando sea posible estandarizar el inóculo. Si el cultivo esta mezclado, las pruebas de susceptibilidad deberán repetirse por un método estándar. (1, 9).

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DIRECTA EN MUESTRA CLÍNICA:

La inoculación directa en placas de susceptibilidad pueden algunas veces proporcionar información preliminar invaluable en problemas de infección clínica urgente. Por ejemplo pruebas directas pueden ser hechas en placas sembradas con muestras de emergencia, tales como líquido cefalorraquídeo, otros fluidos corporales, o muestras purulentas si el Gram directo nos indica un gran número de bacterias de una sola especie, podemos esperar crecimiento. Sin embargo las pruebas de susceptibilidad directa en materia clínica de rutina deben evitarse. Es común encontrar mezclas de organismos en muchas muestras y frecuentemente produce interpretaciones inexactas. Además es muy difícil estandarizar la densidad de un inoculo de materia clínica directa. El uso de una placa purificada para checar será de gran ayuda en estos casos de emergencia, como aseguramiento de la naturaleza de la procedencia del inoculo en la placa de prueba de susceptibilidad. Los resultados de las pruebas de emergencia pueden ser reportados como preliminares o tentativos y se repetirán y confirmarán por uno de los métodos recomendados. Cuando las placas de prueba inoculadas directamente son insatisfactorias el valor de la información preliminar puede ser obtenida haciendo lecturas preliminares de la prueba regular 5 o 6 hrs después de la incubación a 35°C. Cuando esto se hace, la placa debe ser reincubada y el

reporte final se hace después de incubación toda la noche.
(9).

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución es uno de los métodos más recientes para la cuantificación de antimicrobianos en suero, específicamente para quinolonas. El cual muestra buen grado de correlación con el método microbiológico. (8, 9).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de la pefloxacina administrada por vía intraperitoneal en pacientes con insuficiencia renal crónicas tratados por medio de diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y que cursan con cuadro de peritonitis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración alcanzada en líquido peritoneal y suero de Pefloxacina administrada por vía intraperitoneal, oral e intravenosa.

Identificar los microorganismos aislados de los pacientes con peritonitis.

Determinar la sensibilidad hacia la pefloxacina y otros antimicrobianos para los microorganismos aislados.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a que la pefloxacina es un antimicrobiano de uso reciente y dado que la resistencia bacteriana debido a plásmidos no se presenta en este caso, la pefloxacina será efectiva para el tratamiento de la peritonitis pues los niveles alcanzados del antimicrobiano en suero y en líquido peritoneal estarán por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias para las cepas aisladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL DE LABORATORIO

Cajas Petri de 140mm y 90mm Pyrex

Tubos de ensaye 13 x 100 Pyrex.

Tubos de ensaye 18 x 150 Pyrex

Pipetas graduadas 5 mL Pyrex.

Pipetas graduadas 10 mL Pyrex.

Pipetas graduadas 1.0 mL Pyrex.

Pipetas graduadas 2.0 mL Pyrex.

Pipetas graduadas 0.1 mL Pyrex.

Pipetas graduadas 0.2 mL Pyrex.

Pipetas volumétricas 1.0 mL Pyrex.

Pipetas volumétricas 2.0 mL Pyrex.

Pipetas volumétricas 5.0 mL Pyrex.

Pipetas volumétricas 10 mL Pyrex.

Pipetas volumétricas 20 mL Pyrex.

Matraces erlenmeyer 125 mL Pyrex.

Matraces erlenmeyer 250 mL Pyrex.

Matraces erlenmeyer 500 mL Pyrex.

Matraces erlenmeyer 1000 mL Pyrex.

Matraces volumétricos 250 mL Pyrex.

Matraces volumétricos 100 mL Pyrex.

Pipeta semiautomáticas de 20 mL.

Pipeta semiautomática de 100 mL.

Pipeta semiautomática de 200 mL.

Jeringas desechables 5mL Plastipack.

Jeringas desechables 10 mL Plastipack.

Jeringas desechables 20 mL Plastipack.

Frascos de vidrio de 30 mL.

Frascos de vidrio de 5 mL.

Probetas 25 mL Pyrex.

Probetas 50 mL Pyrex.

Probetas 100 mL Pyrex.

Vernier 0.02 a 150 mm Mitutoyo N° 537-120.

Discos de papel filtro Schleicher and Schuel, Alemania
740-E.

Pinzas de disección.

Tubo estándar de turbidez al 0.5 en la escala de Mc Farland.

Material y reactivos de uso común en microbiología:

Asa microbiológica con porta asa

Mechero Bunsen

Mechero Fisher

Cubreobjetos

Portaobjetos

COLORANTES:

Cristal violeta

Yodo lugol

Alcohol-Acetona

Safranina

EQUIPO:

Balanza Analítica Sartorius G150D.

Cuarto incubadora Bigaux Diagnóstica, S.A. 35°C a 37°C.

Cámara fría Bigaux Diagnóstica, S.A. 2°C a 8°C.

Autoclave Interamericana de Equipos.

Replicador de Steers.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Sueros humanos de pacientes con DPCA tratados con Pefloxacina.

Bolsas de diálisis con líquido peritoneal de pacientes tratados con pefloxacina.

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 1346.

Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922.

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25923.

REACTIVOS:

Medio para antibióticos N° 5 Merck.

Agar Mueller-Hinton Merck.

Caldo soya tripticasa Merck.

Base para agar sangre Merck.

Agar Mc Conkey Merck.

Sistema API.

Agar citrato de Simmons Merck.

Caldo nitrato Merck.

Polimixina.

Bacitracina.

Agar Hierro triple azúcar. (TSI) Merck.

Caldo urea Merck.

Caldo Glucosado Merck.

Oxidasa.

CONCENTRACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN Y DILUCIÓN EN PLACA.

ANTIBIÓTICO	DIFUSIÓN conc./disco	DILUCIÓN Potencia
Pefloxacina	5 mcg	92.36%
Cefalotina	30 mcg	93.77%
Ceftriaxona	30 mcg	83.30%
Carbenicilina	100 mcg	78.10%
Ampicilina	10 mcg	76.50%
Amikacina	30 mcg	67.50%
Gentamicina	10 mcg	59.10%

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del grupo de las fluoroquinolonas se ha estudiado a la pefloxacina, la cual presenta actividad no sólo contra bacterias gram negativas, sino también, contra cocos gram positivos particularmente las especies meticilina resistentes de estafilococos, además cuenta con las ventajas del grupo en general (7).

Por estas aseveraciones la pefloxacina es seleccionada como antimicrobiano de primera línea para el tratamiento de peritonitis en pacientes con Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA) ya que se ha observado que se alcanzan rápidamente altos niveles en plasma lo que también sucede en el líquido de diálisis de los pacientes sometidos a DPCA.

Los estudios realizados muestran que la pefloxacina solo ha sido administrada intravenosa y oralmente debido a que se precipita en soluciones salinas concentradas (26); sin embargo es posible que la solución salina específica para diálisis peritoneal no cause ninguna precipitación a las concentraciones normalmente usadas para el tratamiento de peritonitis.

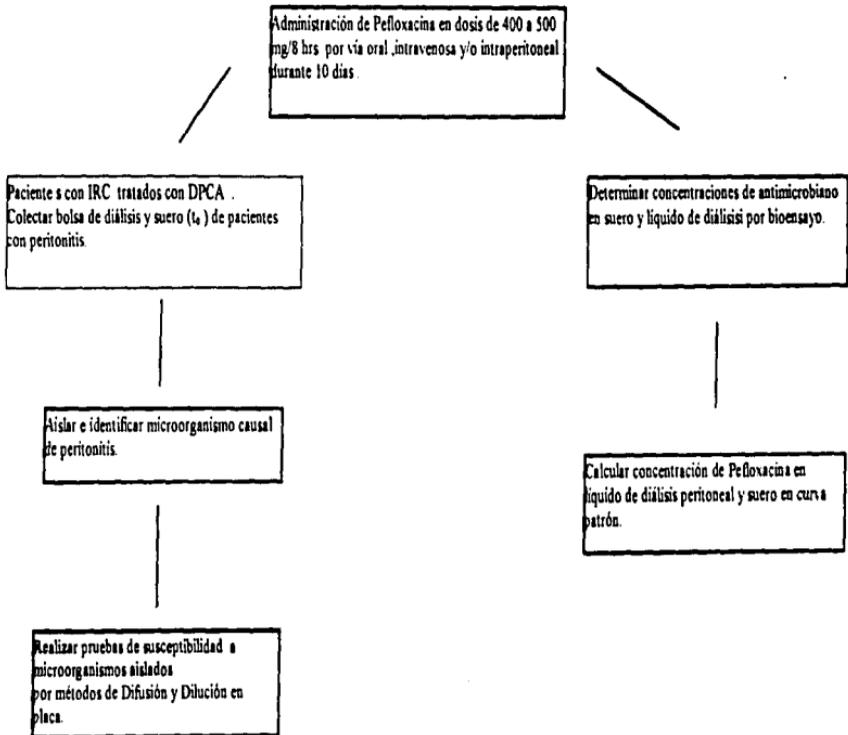
El estudio por tanto se realizará en un grupo de pacientes en donde el rasgo principal es la insuficiencia renal crónica cuyas edades fluctúan entre 40 y 70 años, y en los cuales al efectuarse el tratamiento con DPCA cursan por un estado de peritonitis.

Es por esto que se hace necesario el estudio clínico microbiológico con la administración de la pefloxacina intraperitoneal, obteniendo datos cuantitativos de la concentración de dicho antimicrobiano en el líquido de diálisis para la población mexicana, verificando también los niveles alcanzados en suero de los pacientes.

Además de los resultados clínicos obtenidos durante el tratamiento.

También es importante realizar pruebas de sensibilidad " in vitro " para conocer el patrón de susceptibilidad de las cepas aisladas dada la elevada resistencia que existe de los microorganismos causantes de peritonitis para los antimicrobianos utilizados frecuentemente.

METODOLOGÍA (Diagrama de flujo).



METODOLOGÍA

El estudio se realizará en pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento con DPCA y cursan con cuadro de peritonitis a los cuales se les administrará Pefloxacina oral, intravenosa y/o intraperitoneal durante 10 días en dosis de 400 a 500 mg/8hrs observando las concentraciones que se obtengan en este lapso de tiempo en suero y líquido peritoneal por medio de ensayos biológicos.

Por otro lado se aislarán los microorganismos causales de peritonitis a los cuales se les realizará estudios de susceptibilidad a los 7 antimicrobianos de elección para el tratamiento de peritonitis por medio de técnicas de sensibilidad de dilución y difusión en agar.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA.

A. Preparación del inóculo.

Para la determinación de la concentración del antibiótico se utilizó una técnica microbiológica por difusión en placa (3) empleando el medio para antibióticos N° 5 y una cepa de prueba de *E. coli* (ATCC 1346).

Las placas se preparan en cajas petri de 140 mm con una capa base para siembra.

La capa base consta de 50 mL. de agar en cada caja; para la capa de siembra se prepara un inóculo de un cultivo de *E. coli* en caldo soya, que se ha incubado de 4 a 5 hrs a 37°C, el cual se ajusta al tubo 0.5 de Mc Farland (10^8 UFC/mL), del que se adiciona 1 mL por cada 100 mL de agar que tenga una temperatura de 40°C aproximadamente. se mezcla y se adicionan 10 mL de agar sobre la capa base.

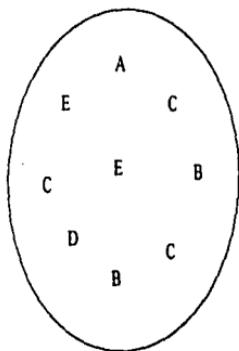
B. Preparación de la curva patrón.

Preparar soluciones de pefloxacina estándar con las siguientes concentraciones:

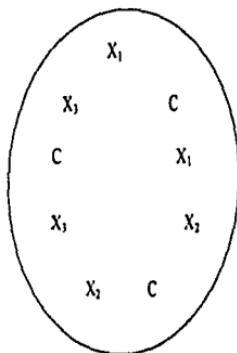
A= 0.040 mcg/0.02 mL
B= 0.130 mcg/0.02 mL
C= 0.440 mcg/0.02 mL
D= 1.509 mcg/0.02 mL
E= 2.270 mcg/0.02 mL

Con las soluciones preparadas impregnar discos de papel filtro (Schleicher and Schuel, Alemania 740-E) con un volumen de 20 mL cada uno.

En las placas preparadas se distribuyen los discos de las diferentes concentraciones de la curva, colocando 2 discos de cada una de las concentraciones A, B, D y E, intercalando un disco de la concentración C para cada dos discos de las diferentes concentraciones (A, B, D y E) respectivamente (ver figura N° 4). Realizar lo anterior por triplicado.



Colocación de discos con soluciones diluidas de Pefloxacin estándar



Colocación de discos de muestras problema C (concentración media estándar)

FIG. N°4 Colocación de discos de antibiótico para curva patrón y muestras problema.

Realizar lo mismo para las muestras problema.

Los discos deben estar uniformemente espaciados y a unos 2 cm. del centro de la placa.

Incubar las placas a 37 °C de 18 a 24 hrs.

Medir los halos de inhibición con un Vernier.

Para elaborar la curva tipo se promedian los diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo C (concentración media) de todas las placas utilizadas (placas de curva y de muestras problema), el promedio obtenido es la base para la corrección.

Calcular el promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida C para la serie respectiva de 3 placas, estos serán los promedios individuales.

Si los promedios individuales son iguales al promedio base de corrección, no es necesario hacer correcciones en los promedios individuales.

Sirva como ejemplo la corrección que corresponde a la zona de inhibición de la solución de mayor concentración (E). Si el promedio base de corrección es de 18 mm y el promedio de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo C de

la serie respectiva de 3 placas (promedio individual) es de 17.8 mm., la corrección es de 0.2 mm. Si el promedio de los diámetros de la misma serie correspondiente a la solución diluida tipo E es de 17.0 mm. el valor correcto es e 17.2 mm.

Con los diámetros corregidos de las zonas de inhibición de las soluciones diluidas tipo A, B, D y E incluyendo el promedio base de corrección para la solución diluida tipo C y las concentraciones de antibiótico respectivos en mcg/mL, se traza la curva patrón en papel semilogarítmico (de 2 ciclos) anotando en las abcisas los diámetros de las zonas de inhibición y en las ordenadas las concentraciones de antibiótico.

La curva patrón se traza a través de estos puntos o bien se unen los puntos correspondientes a las zonas de inhibición de diámetro más alto y más bajo obtenidos por medio de las siguientes ecuaciones:

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

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

L: Diámetro calculado en mm. para la zona de inhibición de la solución diluida tipo de más baja concentración A.

H: Diámetro calculado en mm. para la zona de inhibición de la solución diluida tipo de más alta concentración E.

c: Diámetro promedio, en mm, de todas las zonas de inhibición para la solución diluida tipo C (promedio base de corrección).

a, b, d, e: Diámetros promedio corregidos en mm. de las zonas de inhibición de las otras 4 soluciones tipo A, B, D y E.

C. Ensayo de muestras.

Impregnar discos con los sueros y líquidos peritoneales de los pacientes con DPCA, con un volumen de 20 mL cada uno.

Para determinar la concentración de antibiótico en la muestra se promedian los diámetros de las zonas de inhibición de las 3 placas usadas, tanto de la solución diluida tipo C, como de la muestra problema.

Si el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo C respectiva en la serie de 3 placas es menor que el promedio base de corrección, la diferencia se suma al diámetro promedio para la muestra problema, por el contrario si es mayor se resta.

En la curva tipo trazada se leen las concentraciones correspondientes a esos diámetros de zona de inhibición corregidos.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE PERITONITIS

Inocular 5 frascos para hemocultivo con 3 a 4 mL cada uno de muestras de líquido peritoneal (5 frascos por muestra), incubar 24 hrs a 37°C.

Observar diariamente si existe desarrollo; durante un lapso de tiempo de 15 días.

Realizar la siembra en Agar Mueller-Hinton de los frascos que presenten desarrollo, incubar a 37°C durante 24 hrs.

Aislar el cultivo puro (Cocos gram positivos, Enterobacterias, etc.) en un medio adecuado, para su posterior identificación.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

A. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR (BAUER-KIRBY)

1. Preparar cajas petri de 140 mm con 50 mL de Agar Mueller-Hinton.

2. La cepa a probar se prepara de un cultivo de 24 hrs tomado con el asa de 4 a 5 colonias morfológicamente iguales y sembrando en caldo soya, incubar de 4 a 5 hrs a 35 +/- 2°C.

3. Ajustar la suspensión bacteriana al estándar 0.5 de Mc Farland (10^8 UFC/mL)

4. Sembrar masivamente con hisopo las cajas petri con agar Mueller-Hinton.

5. Colocar unidiscos de papel filtro (Schleicher and Schuel Alemania, 740-E) conteniendo las siguientes concentraciones:

CEFTRIAXONA	30 mcg
AMPICILINA	10 mcg
AMIKACINA	30 mcg
GENTAMICINA	10 mcg
PEFLOXACINA	5 mcg
CARBENICILINA	100 mcg
CEFALOTINA	30 mcg

6. Incubar de 18 a 24 hrs a 35 +/- 2 °C.

7. Medir los halos de inhibición con un Vernier.

8. Con los resultados obtenidos, consultar la tabla siguiente y determinar la sensibilidad del microorganismo:

SUSCEPTIBILIDAD PARA MICROORGANISMOS POR MÉTODO DE DIFUSIÓN
EN AGAR.

Antibiótico	Dosis	R	I	MS	S
Amikacina	30 mcg	<14	15-16		>17
Ampicilina	10 mcg				
Enterobacteriaceae		<11	12-13		>14
Staphylococcus spp		<28			>29
Enterococos		<16		17	
Otros estreptococos		<21		22-29	>30
Carbenicilina	100 mcg				
Enterobacteriaceae		<17	18-22		>23
Pseudomonas spp		<13	14-16		>17
Cefalotina	30 mcg	<14	15-17		>18
Ceftriaxona	30 mcg	<13		14-20	>21
Gentamicina	10 mcg	<12	13-14		>15
Pefloxacina	5 mcg	<14	15-22		>23

R= Resistente, I= Intermedio, MS= Moderadamente sensible, S= Sensible.

Se debe reportar la categoría MS para indicar un nivel de sensibilidad que requiere la máxima dosis permitida para la terapia, las cepas que pertenecen a esta clasificación son sensibles y no deben considerarse como intermedia.

TABLA N°1 (Tomada de referencia N°14).

B. PRUEBA DE DILUCIÓN EN AGAR.

1. De cada antimicrobiano a probar se preparan placas en agar Mueller-Hinton en las que la concentración final por placa sea de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, y 0.125 mcg/mL.

2. Tomar con un asa de 4 a 5 colonias aisladas y sembrar en caldo soya tripticaseína. Incubar durante 4 a 5 hrs a 35 +/- 2°C.

3. La suspensión bacteriana se ajusta al estándar 0.5 de Mc Farland y se diluye 1:10 con solución salina estéril.

4. Con el replicador de Steers se inoculan las placas con cada una de las suspensiones bacterianas ajustadas.

5. Incubar durante 18 a 24 hrs a 35 +/- 2° C.

6. Observar la presencia o ausencia de desarrollo en cada placa, determinando la concentración mínima de antimicrobiano que es capaz de inhibir el desarrollo visible de los microorganismos.

7. Determinar la susceptibilidad para cada microorganismo y antimicrobiano según los valores de corte de la siguiente tabla:

VALORES PARA LA SUSCEPTIBILIDAD DE MICROORGANISMOS POR EL
MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA (mcg/mL).

ANTIBIÓTICO	S	MS	I	R
Ampicilina				
Enterobacterias	<8	16	-	>32
Estafilococos	<0.25	-	-	>0.5
Enterococos	-	<8	-	>16
Amikacina				
Pseudomonas	<16	-	32	>64
Carbenicilina				
Pseudomonas	<128	256	-	>32/16
Otros gram negativos	<16	32	-	>64
Cefalotina	<8	16	-	>32
Ceftriaxona	<8	16-32	-	>64
Gentamicina	<4	-	8	>16
Pefloxacina	<1	-	4-8	>16

R= Resistente, I= Intermedio, MS= Moderadamente sensible,

S= sensible

Tabla N°2 (Tomada de referencia N°1).

CONTROL DE CALIDAD

Para comprobar la eficiencia de la esterilización del material utilizado se emplean métodos biológicos utilizando *Bacillus subtilis* var. Niger (Globig II) y *Bacillus stearothermophilus*.

Las esporas empleadas vienen en un sobre con tres tiras. Se colocan 2 con el material a esterilizar por el sistema empleado (calor húmedo o gas oxido de etileno, según sea el caso) la tercer tira se deja como control.

Se lleva acabo la esterilización por el tiempo y condiciones que requiera el ciclo, al término de la esterilización sacar las tiras de manera aséptica y colocarlas en tubos individuales de caldo soya tripticaseina, así también colocar el control identificando perfectamente todos los tubos.

Incubar a la temperatura específica:

a) A 55 °C para esterilización por calor húmedo.

b) A 32 a 37°C para oxido de etileno, calor seco o por radiación.

Observar si hay crecimiento diariamente, dejar hasta 72 hrs.

También para la esterilidad de los medios empleados, después de la esterilización incubar a 37°C durante 24 hrs antes de su utilización.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Utilizar las cepas control:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Las cepas control utilizadas para medir la reproducibilidad de las técnicas deberán incluirse cada vez que se realicen las pruebas de sensibilidad.

RESULTADOS

El estudio se realizó en un grupo de 20 pacientes con insuficiencia renal crónica, cuyas edades fluctuaron entre los 40 y 70 años a los cuales se les trató por medio de diálisis.

El tipo de diálisis utilizada para dichos pacientes se evaluó de acuerdo a los datos clínicos del paciente diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) o diálisis aguda (D.A.). Se les administró Pefloxacina intraperitoneal durante 3 días y posteriormente oral para DPCA y para D.A. tratamiento intravenoso por un período de 7 días más. Las dosis utilizadas fueron de 400 - 500 mg/8 hrs.

También pudo observarse la disminución de algunos síntomas presentados por los pacientes después de la administración del antimicrobiano observados en las gráficas A y B .

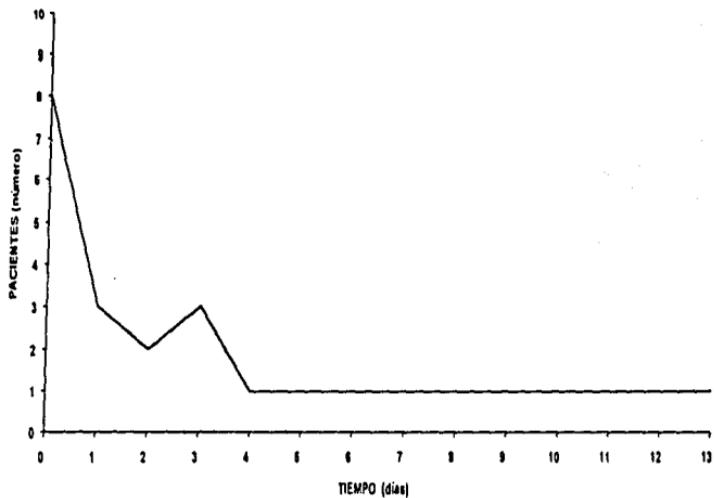
Se determinó la concentración de Pefloxacina en suero y líquido peritoneal de 20 pacientes en períodos de tiempo de 12, 24, 72, 240 y 312 hrs obteniéndose las concentraciones medias mostradas en la tabla N°3 y gráfica C.

En relación a los aislamientos obtenidos se encontraron 26 cepas diferentes teniendo el mayor aislamiento para *Escherichia coli* con 19.2 % siguiéndole en frecuencia *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Ps. aeruginosa* 11.5 % cada uno como puede apreciarse en la tabla N°4. Estas cepas fueron ensayadas por métodos de dilución y difusión en placa para observar la sensibilidad que presentan a Ampicilina, Amikacina, Cefalotina, Ceftriaxona, Gentamicina, Carbenicilina y Pefloxacina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N°5 en la que se observa una buena sensibilidad a la Pefloxacina de las cepas aisladas resultado comparable con el método de dilución (Tabla N°6).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) media encontrada para las diferentes cepas aisladas y observamos que estas son menores que las concentraciones encontradas en líquido peritoneal y suero. (Tabla N°3 y 7).

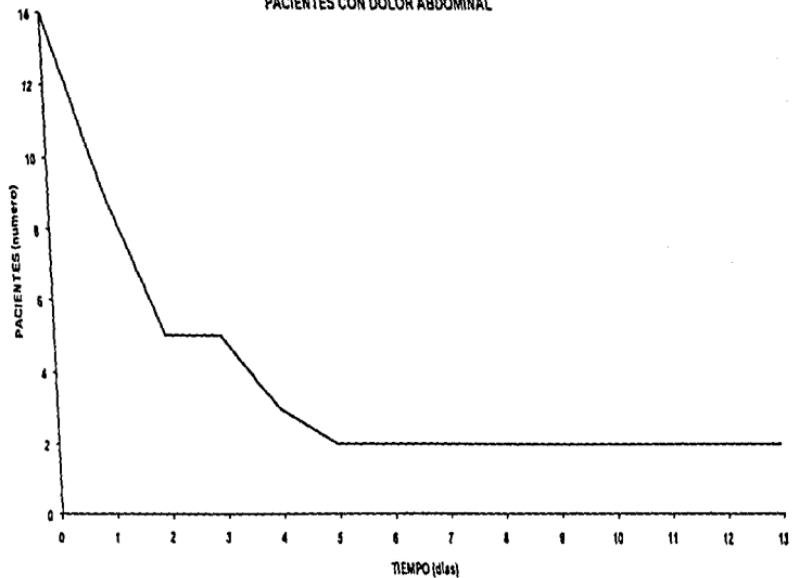
El 90% de los pacientes tuvieron buena respuesta al tratamiento a su peritonitis con Pefloxacina, del 10% restante no se obtuvo respuesta ya que se aislaron cepas de levadura, a los cuales se les suspendió el tratamiento inmediatamente. (Tabla N°8).

PACIENTES QUE PRESENTARON NAUSEA Y VOMITO



GRÁFICA A

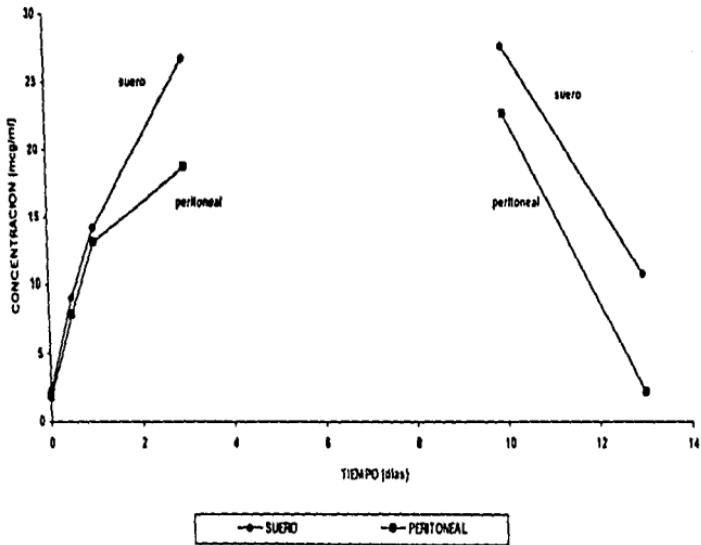
PACIENTES CON DOLOR ABDOMINAL



GRÁFICA B

HORAS/CONC	12 hrs	24 hrs	72 hrs	240 hrs	312 hrs
SUERO	8.96	14.17	26.95	27.73	9.43
LÍQUIDO DE DIÁLISIS PERITONEAL	7.92	13.10	18.78	22.53	2.43

TABLA N°3. Tabla de concentraciones de pefloxacina (mcg/mL) encontradas en suero y líquido de diálisis peritoneal durante el tratamiento.



Gráfica C. Concentración media de Peflosacina en líquido de Diálisis y Suero.

MICROORGANISMO AISLADO	PRECUENCIA	% FRECUENCIA
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	11.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	11.5
<i>Staphylococcus sp.</i>	2	7.7
<i>Micrococcus sp.</i>	4	15.4
<i>Escherichia coli</i>	5	19.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	11.5
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	7.7
<i>Enterococos</i>	1	3.9
<i>Serratia marcescens</i>	1	3.9
<i>Candida sp.</i>	2	7.7
TOTAL	26	100%

TABLA N°4. Frecuencia de microorganismos aislados.

MICROORGANISMO/ANTIMICROBIANO	PEF	AMP	AK	CF	CRO	GE	CB
<i>Enterococo</i>	R	R	S	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	I	S	I	I	R
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus sp.</i>	S	S	S	S	S	S	I
<i>Micrococcus sp.</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia marcescens</i>	I	R	S	I	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	R
<i>Pseudomonas sp.</i>	R	I	S	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	S	R

PEF=Pefloxacina AMP=Ampicilina AK=Amikacina CF=Cefalotina
 CRO=Ceftriaxona GE=Gentamicina CB=Carbenicilina. S=SENSIBLE
 R=RESISTENTE I=INTERMEDIO

TABLA N°5. Tabla de resultados de sensibilidad mostrada a diferentes antimicrobianos por el método de difusión de las cepas aisladas.

MICROORGANISMO/ANTIMICROBIANO	PEF	AMP	AK	CF	CRO	GE	CB
<i>Enterococo</i>	S	R	S	R	R	S	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	I	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus sp.</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Micrococcus sp.</i>	I	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia marcescens</i>	S	R	S	R	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	R	R	I	R
<i>Pseudomonas sp.</i>	S	R	S	R	S	I	I
<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	S	R

PEF=Pefloxacina AMP=Ampicilina AK=Amikacina CF=Cefalotina
 CRO=Ceftriaxona GE=Gentamicina CB=Carbenicilina. S=SENSIBLE
 R=RESISTENTE I=INTERMEDIO

TABLA N°6. Tabla de resultados de sensibilidad mostrada a diferentes antimicrobianos por el método de dilución de las cepas aisladas.

MICROORGANISMO	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIA (CMI) mcg/mL
<i>Enterococo</i>	1.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.50
<i>Staphylococcus sp.</i>	0.25
<i>Micrococcus sp.</i>	4.00
<i>Serratia marcescens</i>	0.50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.00
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.00
<i>Escherichia coli</i>	0.125

TABLA N°7. Tabla de concentraciones mínimas inhibitorias medias de los microorganismos aislados.

DÍAS DE TRATAMIENTO	PRIMER DÍA	SEGUNDO DÍA	TERCER DÍA	CUARTO AL DÉCIMO DÍA
N° DE PACIENTES QUE RESPONDIERON AL TRATAMIENTO CON PEFLOXACINA	10	4	3	1
PORCENTAJE (%)	50	20	15	5
PORCENTAJE ACUMULADO (%)	50	70	85	90

TABLA N°8. Tabla de frecuencia de pacientes que respondieron al tratamiento con Pefloxacina en diferentes períodos.

NOTA: En 2 casos se aisló *Candida sp.* correspondiente al 10%, a los cuales se les suspendió el tratamiento.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se determinó la concentración de Pefloxacina en suero y líquido peritoneal de 20 pacientes obteniéndose que las concentraciones medias de antimicrobiano a las 12 hrs en suero fueron de 8.96 mcg/mL y en líquido peritoneal de 7.92 mcg/mL, a las 24 hrs se observa un incremento en ambos tipos de muestras con un 14.17 mcg/mL y 13.1 mcg/mL respectivamente, el incremento continua hasta el 10° día donde se observa el máximo incremento y aún 3 días después de terminado el tratamiento encontramos niveles de Pefloxacina cuantificable tanto en líquido peritoneal de diálisis como en suero.

A este respecto en otros estudios realizados se encontró que los niveles de Pefloxacina alcanzados en plasma y líquido de diálisis peritoneal fueron de 10.8 mcg/mL y 12.0 mcg/mL respectivamente al 10° día del tratamiento, en ambos casos se cuantifica 12.5 mcg/mL, y 3 días después de finalizado el tratamiento los niveles de Pefloxacina reportados son sólo de 1.0 mcg/mL, apenas la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los microorganismos aislados, con base en lo anterior observamos que en el presente estudio se alcanzaron concentraciones de hasta 9 veces más la CMI en suero y 2 veces más en líquido de diálisis peritoneal. (20)

Lo anterior nos muestra que la Pefloxacina administrada a pacientes por vía intraperitoneal ayuda a alcanzar niveles muy similares a los de suero, los cuales continúan aumentando y se mantienen en concentraciones mayores a las CMIs para la mayoría de los microorganismos aislados incrementando de esta manera la eficacia del antimicrobiano.

Del aislamiento de microorganismos causantes de peritonitis observamos que existe una variedad considerable, los cuales van desde microorganismos cocos gram positivo, enterobacterias así como de tipo levaduriforme. Podemos notar en la tabla de frecuencia de microorganismos (Tabla N°4) que el microorganismo con mayor frecuencia en aislamiento fue *Escherichia coli*, siguiéndole en frecuencia *S.aureus*, *S. epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* y en menor frecuencia *Candida sp.*

Los microorganismos aislados son los que con mayor frecuencia pueden encontrarse como causantes de peritonitis, debido a la manipulación por parte del mismo paciente al realizar los cambios de bolsa para la diálisis peritoneal, *Escherichia coli* es uno de los microorganismos que podemos encontrar ampliamente distribuido en el ambiente como por ejemplo en heces fecales y por consiguiente contaminar las manos de dichas personas, otros microorganismos tales como *Staphylococcus sp.* se encuentran formando parte de la flora en piel, *Pseudomonas sp.* y *Candida sp.* son microorganismos

que se pueden adquirir intrahospitalariamente lo cual origina que el paciente se infecte por este tipo de microorganismos principalmente.

En estudios realizados en USA y Francia encontraron que los principales agentes causales de peritonitis fueron cocos gram positivos dentro de los cuales están *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.* y en menor porcentaje Enterobacterias, *Pseudomonas sp.* y levaduras. Podemos observar que dentro del estudio realizado en México se encontró que el principal agente causal de peritonitis asociada a Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA) corresponde a Enterobacterias principalmente *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* le sigue en porcentaje cocos Gram positivo tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus sp.* esto a causa de que las poblaciones estudiadas tienen diferencias en cuanto a hábitos de higiene y la predisposición a infectarse por un género u otro varían en este sentido, es importante mencionar que en la población mexicana los hábitos de higiene así como el hábitat en que se mueven son considerablemente diferentes, debido a esto existirá variación, en este caso, de los principales agentes causales de peritonitis (20, 13, 15).

En cuanto a los datos clínicos más frecuentes en los pacientes se observa que son náusea, vómito y dolor abdominal.

En los pacientes que presentaron dolor abdominal al primer día del tratamiento el dolor permanece en 9 pacientes, para el segundo día ya sólo en 5 y al final únicamente 2 casos continuaron con el dolor.

En el caso de náusea y vómito en el primer día hay disminución notable, continuando con los síntomas sólo 3 pacientes, en el segundo día sólo 2 continuaron con los síntomas.

La permanencia de los síntomas en algunos de los casos pudo ser debida al agente causal del cuadro, a los cuales hubo que suspender el antimicrobiano dando tratamiento adecuado a su peritonitis.

Las pruebas de susceptibilidad de los microorganismos aislados se realizaron por dos métodos difusión y dilución en placa. En el método de difusión en placa observamos mayor grado de resistencia para las cepas a cada uno de los antimicrobianos, esto debido tal vez a que por el método de dilución existe mejor distribución del antimicrobiano permitiéndole actuar con mayor eficacia, por otro lado es posible que haya disminuido la actividad del antimicrobiano por la transferencia del antimicrobiano al utilizar el método de difusión, la forma de distribución del microorganismo en este es más variable en cuanto a la cantidad de inculo depositado en el medio de cultivo ya que se realiza por medio

de hisopo en en cual no puede controlarse la cantidad de microorganismos que este absorberá, lo cual no sucede en el método de dilución donde la cantidad de microorganismos está mejor controlada al inocular las placas por medio del Replicador de Steera, por otro lado en el método de difusión sólo se obtiene la clasificación de los microorganismos en forma semicuantitativa siendo necesario reforzar los resultados obtenidos por un método cuantitativo.

Las pruebas de susceptibilidad realizadas a los microorganismos aislados, por los métodos de difusión y dilución en placa en los cuales se probaron 7 antimicrobianos para cada uno, mostrando buena sensibilidad a la Pefloxacina en su mayoría. Para el caso de *Pseudomonas sp.*, observamos que es uno de los microorganismos que presentan mayor resistencia a gran parte de los antimicrobianos al ser probados por un método de difusión, no así para el método de dilución donde encontramos buena sensibilidad a la Pefloxacina, debido a esto se recomienda que en el caso de aislar *Pseudomonas sp.* de cualquier cultivo las pruebas de susceptibilidad se realicen por el método de dilución.

En comparación con otros estudios en los cuales no ha sido controlada la eficacia de los antibióticos en casos de peritonitis asociada con Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA), en donde se encontró que el Mesilato de Pefloxacina no fué un óptimo tratamiento para peritonitis y

en enfermedades causadas por gram negativos necesitaban mayor evaluación esto al administrarlo por vía oral, podemos mencionar que en el estudio realizado la Pefloxacina mostró se eficaz tanto para microorganismos gram positivos como para gram negativos, donde se observó buena sensibilidad a la Pefloxacina al ser administrada por vía intraperitoneal (20).

La sensibilidad mostrada a la Pefloxacina por los microorganismos aislados, está relacionada con la buena respuesta por parte de la mayoría de los pacientes los cuales tuvieron mejoría notable a su peritonitis una vez iniciado el tratamiento, tanto clínica como bacteriológicamente.

Al respecto cabe mencionar que en diversos estudios al ser probada la Pefloxacina así como otras fluoroquinolonas tales como la Ciprofloxacina se obtuvo mejoría en pacientes con peritonitis asociada a DPCA en 82.6% y 83% respectivamente, lo cual nos indica que en el estudio realizado se obtienen resultados muy aproximados a los ya reportados corroborando que la Pefloxacina es un antimicrobiano que posee un amplio espectro para curar un alto porcentaje de pacientes que cursen con peritonitis asociada a DPCA. (13, 15)

CONCLUSIONES

La pefloxacina es uno de los antimicrobianos de nueva generación dentro del grupo de las fluoroquinolonas cuyas propiedades farmacológicas y microbiológicas lo hacen uno de los antimicrobianos de primera elección en el tratamiento de infecciones sistémicas.

En el tratamiento con Pefloxacina a casos de peritonitis bacteriana encontramos disminución e incluso eliminación de los síntomas presentados antes del mismo.

Las concentraciones obtenidas en bolsas de líquido de diálisis de pefloxacina administrada intraperitoneal y oral fueron muy similares a las encontradas en suero, de lo cual podemos inferir que el estado inflamatorio del peritoneo no interfiere en la difusión del antimicrobiano.

Las concentraciones mínimas inhibitorias medias evaluadas por un método de dilución en placa encontradas para la mayoría de los microorganismos fueron menores a las encontradas en las bolsas de líquido peritoneal y suero, concentraciones que permitieron la eliminación del microorganismo causal de peritonitis.

Se encontraron variaciones respecto a los métodos utilizados para evaluar la susceptibilidad de los

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

microorganismos aislados, lo cual nos indica que es necesario que se tomen todas las precauciones debidas y corroborar resultados obtenidos por un método de difusión con un método de dilución.

El estudio mostró que la Pefloxacina administrada por vía intraperitoneal es un antibiótico conveniente seguro y efectivo para el tratamiento de los pacientes tratados con Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA) que presenten peritonitis sobre todo en pacientes que hayan cursado con peritonitis anteriores y cuyos microorganismos causales presenten resistencia a otros antimicrobianos de elección.

Es importante mencionar que el tratamiento podría llevarse a cabo asociando otros antimicrobianos para prevenir el desarrollo de cepas resistentes durante el tratamiento sobre todo de microorganismos tales como *Staphylococcus sp.* que son uno de los principales responsables de peritonitis.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan Waitz, Ph. D. y cols. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2ª ed. NCCLS Approved Standard M7-A2. April 1990: 10/8.
2. Bejeur, G., Holzgrabe, U., Jurgens, J. Gyrase inhibitors. Therapy and theoretical background. PZ. WISS 1992; 137/4: 149-159.
3. Benzakour, M., Lagarde C., et al. Peritonitis during Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. Nepron. 1988; 50: 175-176.
4. Braude, I. Abraham. Microbiología Clínica. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1984: 41-43.
5. Davis, D. B., Dulbeco, R., et al. Tratado de Microbiología. 3ª ed. Barcelona, España: Editorial Salvat S.A.; 1984: 94-95, 145-147.
6. Department of Urology, Municipal St. Istvan Hospital -Outpatient Clinic, Budapest. Use of pefloxacin in urogenital infections, Ther Hung (HUNGARY) 1992: 40/2: 72-75.

7. Goodman and Guillman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8ª ed. Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1991: 1027-1030.

8. Grigga, D. J., Wise, R. A simple isocratic high-pressure liquid chromatographic assay of quinolones in serum. Chemical Abstracts 1990; 12: 6.

9. H. Lennette, Edwin; Balows, Albert; J. Hausler Jr. ; P. Truant, Joseph. Manual of Clinical Microbiology. 3ª ed. Washington D.C. U.S.A.: American Society for Microbiology; 1980: 446-485.

10. Jawetz E., L. Melnick J., et al. Microbiología Médica. 12ª ed. México D.F.: Editorial El Manual Moderno, 1987 pp 36-39, 67-68.

11. Kaats, G. W.; Seo, S. M.; Ruble, C.A. Mechanism of fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal Infectology Diseases 1991; 163/5: 1080-1086.

12. Lewin, C. S.; Morrissey, I. ; Smith, J. T. The mode of action of quinolones; The Paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. Europe Journal Clinical Microbiology Infections Diseases 1991; 10/4: 240-248.

13. Ludlam AH., et al. Intraperitoneal ciprofloxacin for the treatment of peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1990; 25:843-851.

14. Mary Jane Ferraro. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. NCCLS Tentative Standard M2-T4 1989: 8/7.

15. Michael C. Viran, Delisle F., Lependoven C., Mignon F. Traitement des péritonites en dialyse péritoneale continue ambulatoire par l'association foscymycine-péfloxaciné. *Patologie biologique*. 1989; 37/4: 269-271.

16. Ohshita, Yoshiro, Hiramatsu Kiichii, Yokota, Takeshi. A point mutation in *norA* gene is responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Genetics*. 1991; 114: 147-148.

17. Petersdorf G. Robert, Adams D. Raymond. *Principios de Medicina Interna* 6ª ed México D.F.; Editorial Mc Graw Hill; 1986: Vol II: 914-917, 1426-1435, 1600.

18. Pipper, J.P.; Chang, G.L. Quinolone use in critical care. *Problem Critical Care* 1992; 6/1: 64-83.

19.Randall C. Walker, Alan Wright MD. The Quinolones. Mayo Clin Proc. 1987; 62:1007-1012.

20.Rose F. T., Pegler Ellis R., et al. Oral pefloxacin mesylate in the treatment of continuous ambulatory peritoneal dialysis associate peritonitis: an open non-comparative study. Journal of Antimicrobial Chemoterapy. 1990: 657-664.

21.Service d'Urologie, Hospital Charles Nicolle, Tunis, Tunisie. Efficacite et tolerance de la pefloxacine dans le traitement des infections urinaires compliquees en Tunisie. Clinical Trial; Journal Article, Nov. 1992; 70/11: 541-546.

22.Shenderov BA; Glukhova EV; Viadro MM. Microbial ecology of laboratory animals as a model in evaluation of the immunomodulating and antimicrobial agents. Antibiot Khimioter (RUSSIA) Aug 1992; 37/8: 39-43.

23.Shimada J. Comparative pharmacokinetics of the new quinolone agents. Washington D.C. En Leive ed. Microbiology American Society of Microbiology 1986: 222-225.

24.Smith Jt. The 4-quinolone antibacterials. En Greenwood D. O'Grady F. Cambridge, Cambridge University Press. The scientific basis of antimicrobial chemoterapy. 1985: 69-94.

25. Takacs, Novack K.; Gabor, T. Takacs M.;
Antibacterials fluoroquinolones. I. Medicinal chemistry.
Gyogyszereszet Cambridge, Cambridge University Press. 1991;
35/6: 279-285.

26. Webberly JM., Donovan I., et al. Intraperitoneal
penetration of pefloxacin. Medicals Journals 1988; 7: 207-
208.

27. Wolfson JS., Hooper DC. The fluoroquinolones:
structures, mechanism of action and resistance, and spectra
of activity in vitro. Antimicrobials Agents Chemotherapy
1985; 28: 585-586.

28. Zinsser K. Joklik, Wolfgang P Willett, et al.
Microbiología. 18ª ed. Buenos Aires Argentina Editorial
Médica Panamericana; 1987: 141-154.