
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LEUCOCITARIA
EN PRESENCIA Y EN FASE POSTANTIBIÓTICA DE
ANTIMICROBIANOS BETALACTÁMICOS.**

TESIS DOCTORAL

Irene Herrera Insúa

Madrid, Septiembre 1995

D. José Prieto Prieto, Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y D^a María Luisa Gómez-Lus Centelles, Profesora titular del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado:

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LEUCOCITARIA EN PRESENCIA Y EN FASE POSTANTIBIÓTICA DE ANTIMICROBIANOS BETALACTÁMICOS, constituye la Memoria presentada por Irene Herrera Insúa para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

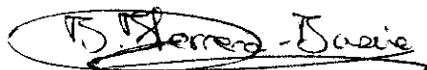
Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Septiembre de 1995.



Fdo. Prof. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles



Fdo. José Prieto Prieto



Fdo. Irene Herrera Insúa

AGRADECIMIENTOS:

Al Prof.Dr. José Prieto Prieto, por la confianza que depositó en mí, por el interés que mostró en mi trabajo y por su inestimable ayuda.

A la Prof.Dra. M^a Luisa Gómez-Lus, por su orientación en el desarrollo de este trabajo, su constante ayuda y acertados consejos.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología, por su colaboración.

A la Dra. Paola Pérez Fernández.

A mi familia.

A mis padres.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	2
1. Antecedentes del tema	2
2. Objetivos	6
3. Acción de los antimicrobianos sobre los leucocitos	
polimorfonucleares	7
3.1. Acción directa de los antimicrobianos sobre las funciones	
de los leucocitos PMNs	8
3.1.1. Penetración y actividad de los antimicrobianos en el	
interior de los fagocitos	8
3.1.2. Quimiotaxis	8
3.1.3. Fagocitosis y muerte intracelular de los microorganismos	9
3.2. Acción indirecta de los antimicrobianos sobre las funciones	
de los leucocitos PMNs	10
3.2.1. Efecto de las concentraciones sub-CMI	10
3.2.2. Efecto PALE	12
4. Antimicrobianos	16
4.1. Propiedades de los antibióticos betalactámicos	16
4.2. Carbapenemes	17
4.2.1. Imipenem	18
4.2.1.1. Estructura química	18
4.2.1.2. Mecanismo de acción	18
4.2.1.3. Actividad bactericida	18
4.2.1.4. Resistencia a β-lactamasas	19
4.2.1.5. Espectro antimicrobiano	19
4.2.1.6. Farmacocinética	19
4.2.1.7. Indicaciones terapéuticas	20
4.2.1.8. Reacciones adversas	20
4.2.2. Meropenem	20
4.2.2.1. Estructura química	20
4.2.2.2. Mecanismo de acción	21
4.2.2.3. Actividad bactericida	21
4.2.2.4. Resistencia a β-lactamasas	21
4.2.2.5. Espectro antimicrobiano	22

4.2.2.6. Farmacocinética	22
4.2.2.7. Indicaciones terapéuticas	23
4.2.2.8. Reacciones adversas	23
4.3. Cefalosporinas	23
4.3.1. Cefepime	23
4.3.1.1. Estructura química	23
4.3.1.2. Mecanismo de acción	24
4.3.1.3. Actividad bactericida	24
4.3.1.4. Resistencia a β -lactamasas	24
4.3.1.5. Farmacocinética	25
4.3.1.6. Espectro antimicrobiano	25
4.3.1.7. Indicaciones terapéuticas	25
4.3.1.8. Reacciones adversas	25
4.3.2. Cefpodoxima	26
4.3.2.1. Estructura química	26
4.3.2.2. Mecanismo de acción	26
4.3.2.3. Actividad bactericida	26
4.3.2.4. Resistencia a β -lactamasas	27
4.3.2.5. Espectro antimicrobiano	27
4.3.2.6. Farmacocinética	27
4.3.2.7. Indicaciones terapéuticas	28
4.3.2.8. Reacciones adversas	28
II. MATERIAL Y METODOS	30
1. Material	30
1.1. Microorganismos	30
1.2. Antimicrobianos	30
1.3. Suero y leucocitos polimorfonucleares	30
1.3.1. Obtención del suero humano	30
1.3.2. Obtención, cómputo y viabilidad de los leucocitos polimorfonucleares	30
1.3.2.1. Obtención de leucocitos PMNs	30
1.3.2.2. Cómputo celular	31
1.3.2.3. Viabilidad celular	32

2. Métodos	32
2.1. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs)	32
2.2. Estudio del Efecto Postantibiótico Leucocitario (PALE)	32
2.2.1. Preparación del inóculo	32
2.2.2. Tratamiento antimicrobiano	33
2.2.3. Estudio del efecto antimicrobiano en el crecimiento	33
2.2.4. Estudio de la sensibilidad al suero	33
2.2.5. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs en la fase postantibiótica. PALE	34
2.3. Estudio de la actividad bactericida de leucocitos PMNs en presencia continua de antimicrobianos	35
2.3.1. Preparación del inóculo	35
2.3.2. Estudio de las curvas de letalidad de <u>E.coli</u> y <u>S. aureus</u>	35
2.3.3. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs en presencia continua de antimicrobianos	35
2.4. Métodos de cálculo estadístico	36
III. RESULTADOS	38
1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs)	38
2. Estudio del efecto postantibiótico leucocitario	38
2.1. Estudio del pretratamiento antimicrobiano sobre el crecimiento bacteriano	38
2.1.1. Efecto sobre el crecimiento de <u>E. coli</u>	38
2.1.1.1. Efecto de imipenem	38
2.1.1.2. Efecto de meropenem	39
2.1.1.3. Efecto de cefepime	39
2.1.1.4. Efecto de cefpodoxima	40
2.1.2. Efecto sobre el crecimiento de <u>S. aureus</u>	40
2.1.2.1. Efecto de imipenem	40
2.1.2.2. Efecto de meropenem	41
2.1.2.3. Efecto de cefepime	41
2.1.2.4. Efecto de cefpodoxima	41
2.2. Efecto del suero en el crecimiento bacteriano	42

2.2.1. Efecto del suero en el crecimiento de <u>E. coli</u>	42
2.2.1.1. Efecto del suero en el crecimiento de <u>E. coli</u> no pretratado con antimicrobiano	42
2.2.1.2. Efecto del suero en el crecimiento de <u>E. coli</u> pretratado con imipenem	43
2.2.1.3. Efecto del suero en el crecimiento de <u>E. coli</u> pretratado con meropenem	43
2.2.1.4. Efecto del suero en el crecimiento de <u>E. coli</u> pretratado con cefepime	44
2.2.1.5. Efecto del suero en el crecimiento de <u>E. coli</u> pretratado con cefpodoxima	44
2.2.2. Efecto del suero en el crecimiento de <u>S. aureus</u>	45
2.2.2.1. Efecto del suero en el crecimiento de <u>S. aureus</u> no pretratado con antimicrobiano	45
2.2.2.2. Efecto del suero en el crecimiento de <u>S. aureus</u> pretratado con imipenem	45
2.2.2.3. Efecto del suero en el crecimiento de <u>S. aureus</u> pretratado con meropenem	46
2.2.2.4. Efecto del suero en el crecimiento de <u>S. aureus</u> pretratado con cefepime	47
2.2.2.5. Efecto del suero en el crecimiento de <u>S. aureus</u> pretratado con cefpodoxima	47
2.3. Actividad de los leucocitos PMNs. P.A.L.E	48
2.3.1. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u>	48
2.3.1.1. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> no pretratado con antimicrobiano	48
2.3.1.2. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> pretratado con imipenem	49
2.3.1.3. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> pretratado con meropenem	51
2.3.1.4. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> pretratado con cefepime	53

2.3.1.5. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> pretratado con cefpodoxima	55
2.3.2. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u>	57
2.3.2.1. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> no pretratado con antimicrobiano	57
2.3.2.2. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> pretratado con imipenem	58
2.3.2.3. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> pretratado con meropenem	61
2.3.2.4. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> pretratado con cefepime	63
2.3.2.5. Actividad de los leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> pretratado con cefpodoxima	65
3. Estudio de la actividad bactericida de los leucocitos PMNs en presencia continua de antimicrobianos	70
3.1. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> en presencia continua de antimicrobianos	70
3.1.1. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> en presencia continua de imipenem	70
3.1.1.1. Efecto de 1/2 CMI de imipenem	70
3.1.1.2. Efecto de 4 CMI de imipenem	70
3.1.2. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> en presencia continua meropenem	72
3.1.2.1. Efecto de 1/2 CMI de meropenem	72
3.1.2.2. Efecto de 4 CMI de meropenem	73
3.1.3. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> en presencia continua cefepime	74
3.1.3.1. Efecto de 1/2 CMI de cefepime	74
3.1.3.2. Efecto de 4 CMI de cefepime	75
3.1.4. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> en presencia continua cefpodoxima	76
3.1.4.1. Efecto de 1/2 CMI de cefpodoxima	76
3.1.4.2. Efecto de 4 CMI de cefpodoxima	77

3.2. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> en presencia continua de antimicrobianos	78
3.2.1. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> en presencia continua de imipenem	78
3.2.1.1. Efecto de 1/2 CMI de imipenem	78
3.2.1.2. Efecto de 4 CMI de imipenem	80
3.2.2. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> en presencia continua meropenem	81
3.2.2.1. Efecto de 1/2 CMI de meropenem	81
3.2.2.2. Efecto de 4 CMI de meropenem	82
3.2.3. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> en presencia continua cefepime	84
3.2.3.1. Efecto de 1/2 CMI de cefepime	84
3.2.3.2. Efecto de 4 CMI de cefepime	85
3.2.4. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a <u>S. aureus</u> en presencia continua cefpodoxima	86
3.2.4.1. Efecto de 1/2 CMI de cefpodoxima	86
3.2.4.2. Efecto de 4 CMI de cefpodoxima	87
IV. GRÁFICOS	91
V. DISCUSIÓN	124
1. Análisis del método experimental	124
1.1. Preparación del inóculo	124
1.2. Pretratamiento antimicrobiano y exposición continua de los microorganismos al antimicrobiano	125
1.2.1. Pretratamiento antimicrobiano	125
1.2.2. Exposición continua de los microorganismos al antimicrobiano	126
1.3. Extracción de leucocitos PMNs	126
1.4. Lisis de los leucocitos y efecto del pH en las bacterias	127
2. Análisis de los resultados	128
2.1. Efecto postantibiótico leucocitario (PALE)	128
2.1.1. Efecto del pretratamiento antimicrobiano sobre la cinética de crecimiento de <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u>	128
2.1.1.1. Efecto del pretratamiento antimicrobiano de <u>E. coli</u>	128

2.1.1.2. Efecto del pretratamiento antimicrobiano de <u>S. aureus</u>	130
2.1.2. Efecto del suero sobre la cinética de crecimiento de <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u>	131
2.1.2.1. Efecto del suero sobre <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u> control	131
2.1.2.2. Efecto del suero sobre <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u> pretratados	133
2.1.3. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs	135
2.1.3.1. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u> control	135
2.1.3.2. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u> pretratados	136
2.2. Efecto de la presencia continua de antimicrobianos sobre la actividad bactericida de los leucocitos PMNs	144
2.2.1. Cinéticas de letalidad en <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u>	144
2.2.1.1. Cinéticas de letalidad en <u>E. coli</u>	144
2.2.1.2. Cinéticas de letalidad en <u>S. aureus</u>	145
2.2.2. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs frente a <u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u> en presencia de antimicrobianos	145
3. Aplicación clínica de los estudios sobre la modificación de la actividad leucocitaria en fase postantibiótica y en presencia de antimicrobiano	151
VI. CONCLUSIONES	155
VII. BIBLIOGRAFÍA	158
VIII. APENDICE	181

ABREVIATURAS

CMB	Concentración Máxima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DE	Desviación Estándar
DHP-I	Dehidropeptidasa I
HBSS	Solución Salina Equilibrada de Hank
Ig	Inmunoglobulina
IV	Intravenosa
PAE	Efecto postantibiótico
PALE	Efecto Postantibiótico Leucocitario
PBPs	Proteínas Fijadoras de Penicilina
PMNs	Polimorfonucleares
SAMR	<u>Staphylococcus aureus</u> meticilina resistente
SHN	Suero Humano Normal
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES DEL TEMA

La investigación de los efectos inmunomoduladores de los antimicrobianos comenzó casi al mismo tiempo que su desarrollo. Numerosos investigadores apoyaron las observaciones de los estudios de Metchnikoff, publicados a principios de este siglo, que demostraban la importancia de las células fagocíticas en la defensa del organismo contra agentes microbianos. Desde entonces diferentes estudios señalaron que los antibióticos son normalmente ineficaces para el tratamiento de infecciones en ausencia de células fagocíticas competentes. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones estaban centradas en el estudio de las relaciones entre los microorganismos y los antibióticos.

En los últimos veinte años, el número creciente de pacientes inmunocomprometidos que presentan infecciones difíciles de tratar y el intento de reducir los problemas de infecciones nosocomiales y superinfecciones, ha estimulado la investigación para una mejor comprensión de las interacciones entre los antibióticos y el proceso fagocítico, y selección de agentes con propiedades inmunoestimuladoras que puedan ayudar en la recuperación de la infección.

El interés de la interacción entre antimicrobianos y fagocitos: leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, se ha centrado en:

- la influencia de los antibióticos en la quimiotaxis
- la acción directa de los antibióticos en las funciones de las células fagocíticas, como fagocitosis, muerte intracelular y respuesta metabólica
- fagocitosis y muerte de las bacterias alteradas por el contacto previo con el antimicrobiano
- penetración intracelular de los antibióticos y actividad intracelular contra las bacterias fagocitadas (1).

Los resultados presentan grandes dificultades para su comparación e interpretación debido a las variaciones en la metodología empleada para el ensayo de las funciones fagocitarias y las diferencias en el diseño experimental, incluyendo las concentraciones empleadas y el tipo de células fagocíticas y microorganismos utilizados. Por otra parte, el intento de delimitar variables para correlacionar los resultados

obtenidos *in vitro*, con la situación *in vivo*, es complejo. Los resultados *in vivo* dependen del modelo animal escogido y la posibilidad de que la respuesta sea debida a factores individuales del hospedador, debe ser siempre considerada. Los resultados de los experimentos *in vitro* pueden aclarar los mecanismos específicos de la potenciación o inhibición de determinados parámetros del sistema inmune y los resultados de los experimentos *in vivo* pueden proporcionar información útil para el tratamiento empírico (2).

La terapia continua, cuyo objetivo es mantener los niveles del fármaco por encima de la concentración mínima inhibitoria durante el intervalo entre dosis, sigue siendo la base de la mayoría de los regímenes de antibióticos empleados corrientemente (3). Sin embargo, en la década de los cuarenta, la experiencia clínica demostró que una terapia satisfactoria para la neumonía neumocócica con penicilina, se podía alcanzar con un régimen de dosis discontinuo, proporcionando niveles inhibitorios durante solo la mitad del intervalo entre dosis.

La supresión persistente del crecimiento bacteriano después de la exposición al antibiótico, descrita como efecto postantibiótico (PAE) (4), ha sido confirmado para varias clases de antibióticos. El interés en conocer el fenómeno PAE radica en el ánimo de establecer terapias antimicrobianas discontinuas eficaces.

El PAE *in vivo* permitiría un descenso de los niveles de antibiótico en los tejidos, de manera que la actividad antibacteriana pudiese estar ausente durante una fracción del intervalo de dosis, sin pérdida de la eficacia del antimicrobiano como resultado de un recrecimiento bacteriano (5).

Aunque el efecto postantibiótico confiere ventaja al hospedador, es bastante improbable que sea la explicación suficiente del éxito de la terapia antibacteriana discontinua (3). La participación de los factores de defensa del organismo en la eliminación de las bacterias, después de una exposición a niveles suprainhibitorios de antibiótico, ha sido demostrado *in vitro* por varios grupos (Alexander y Good, 1968 (6); Solberg, 1978 (7); Horne y Tomasz, 1981 (8); McDonald, Wetherall y Prui, 1981 (9).

McDonald et al. demostraron que microorganismos en fase postantibiótica son más sensibles a la fagocitosis y muerte por leucocitos humanos y llamaron a este

fenómeno, efecto P.A.L.E. (Postantibiotic Leukocyte Enhancement).

Algunos autores estudian las variaciones en el efecto fagocítico y bactericida de los leucocitos cuando se exponen a un pretratamiento antimicrobiano y posteriormente se incorporan los microorganismos (10) o exponiendo conjuntamente los leucocitos y bacterias a la acción antimicrobiana (11).

En la situación *in vivo*, el tiempo real de contacto de la bacteria con niveles suprainhibitorios de antibiótico, puede ser realmente corto, especialmente con una dosificación intermitente. Sin embargo, una breve exposición de la bacteria al antibiótico puede ser importante en el resultado terapéutico. La exposición a concentraciones terapéuticas de antibióticos con distintos mecanismos de acción ha demostrado alterar la superficie celular bacteriana (12). Estos cambios pueden traer consigo alteraciones en una gran variedad de propiedades de la superficie celular importantes en la interacción con los componentes de defensa del hospedador, incluyendo cambios en los antígenos de superficie celular (13,14), hidrofobicidad (15), excreción de toxinas y enzimas (16), pérdida de lipopolisacáridos y cambios en el grosor de la pared celular (12,17). Mientras las perturbaciones inducidas por el antibiótico en la superficie bacteriana alteran su interacción con las opsoninas y las células fagocíticas, los mecanismos por los cuales se modula la sensibilidad a la muerte fagocítica son bastante desconocidos. Se ha demostrado que el incremento de la muerte del estreptococo β -hemolítico del grupo A por leucocitos, después de una breve exposición a eritromicina, se debe a un aumento de la ingesta fagocítica (18), mientras el incremento de la muerte de Escherichia coli después de la exposición a cloranfenicol depende de un aumento de la muerte intracelular (19); y el aumento de opsonización es el mecanismo por el cual la exposición de cocos Gram-positivos a niveles subinhibitorios de clindamicina, incrementa la sensibilidad a la muerte por células fagocíticas (14,20). Están implicados mecanismos de muerte intracelular tanto dependientes (19,21) como independientes de oxígeno (22).

Nuestro interés en este trabajo se ha centrado en el estudio de la actividad bactericida de leucocitos polimorfonucleares, en dos sentidos. Primero, el efecto de una breve exposición de las bacterias a antimicrobianos betalactámicos, que simula niveles

de antibiótico alcanzados *in vivo* durante el tiempo en que el fármaco está presente, en un régimen de dosificación discontinuo, y evita cualquier interacción entre el antibiótico y los polimorfos.

El resultado de una infección puede ser considerado como consecuencia de la interacción entre una combinación de factores, en los cuales el antibiótico puede interaccionar de forma sinérgica o antagónica, con los fagocitos en la eliminación de la bacteria.

En segundo lugar, estudiamos la fagocitosis y muerte intracelular de las bacterias en presencia del antimicrobiano, polimorfonucleares y factores séricos, más próximo a la situación real *in vivo* donde el antimicrobiano puede penetrar en los compartimientos intracelulares de los polimorfos y se superponen las interacciones entre antibiótico-leucocitos PMNs, antibiótico-microorganismos y leucocitos PMNs-microorganismos.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Determinar si un breve tratamiento de Escherichia coli y Staphylococcus aureus con cuatro veces la CMI de los antimicrobianos: imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima, induce una supresión significativa del crecimiento bacteriano postantibiótico o efecto PAE.

2. Estudiar si dicho tratamiento influye en la sensibilidad de ambos microorganismos al suero humano normal.

3. Cuantificar el cambio en la sensibilidad a la muerte fagocítica por leucocitos polimorfonucleares humanos (PMNs), de microorganismos pretratados con los antimicrobianos mencionados en fase postantibiótica, efecto PAE.

4. Cuantificar el cambio en la sensibilidad de los microorganismos, a la muerte fagocítica por PMNs humanos, en presencia continua de los antimicrobianos de este estudio.

5. Analizar si el cambio en la sensibilidad de los microorganismos a la muerte fagocítica por PMNs, en la fase postantibiótica y en presencia continua de antibiótico, está condicionado por el tipo de antimicrobiano, microorganismo o ambos factores.

3. ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Los leucocitos especialmente los granulocitos neutrófilos, constituyen el mecanismo fundamental de eliminación de los gérmenes presentes en los tejidos. La respuesta neutrófila ante una infección bacteriana localizada se desarrolla en varias etapas. En primer lugar se produce la movilización de los leucocitos desde la médula ósea a la circulación sanguínea. Luego, los leucocitos neutrófilos circulantes se adhieren al endotelio de los capilares vecinos al área infectada y lo atraviesan, pasando así al espacio intersticial, y migran hacia el foco inflamatorio. Estos pasos son mediados y estimulados por una serie de sustancias que actúan como factores quimiotácticos. Los factores quimiotácticos más importantes son ciertos productos de la activación del complemento, como el C3a, C5a y C567, sustancias de origen bacteriano y sustancias producidas por los propios leucocitos (como el leucotrieno B4). Tras la llegada de los neutrófilos al lugar de la infección se inicia el proceso de la fagocitosis de las bacterias. La fagocitosis bacteriana a cargo de los neutrófilos se ve favorecida por sustancias con capacidad opsonizante, como las inmunoglobulinas, productos del complemento, fibronectina y otras, las cuales permiten la adherencia de las bacterias a la membrana del leucocito. Una vez las bacterias han sido fagocitadas se produce su destrucción intracelular, realizada principalmente a través de mecanismos independientes de oxígeno o dependientes de oxígeno que pueden ser mediados o no por mieloperoxidasa.

Muchos antimicrobianos han demostrado su capacidad para interferir con diversos aspectos del sistema de defensa del hospedador, como la adherencia microbiana, producción de toxinas, quimiotaxis, opsonización, ingestión y muerte fagocítica por leucocitos PMNs, y modulación de la respuesta de las células T y B.

Los antibióticos pueden interactuar con los PMNs de dos formas: el antimicrobiano puede alterar las funciones de los leucocitos (efecto directo) y la bacteria puede ser modificada por el antibiótico con consecuencias indirectas en la fagocitosis y/o muerte intracelular por el PMN (efecto indirecto). Un tercer modo de interacción, del cual existen pocos datos, sería la modificación del antibiótico por los PMNs (23).

3.1. Acción directa de los antimicrobianos sobre las funciones de los leucocitos PMNs.

3.1.1. Penetración y actividad de los antimicrobianos en el interior de los fagocitos.

La entrada de los agentes antimicrobianos es un requisito para la actividad contra bacterias intrafagocíticas. En la penetración de los antimicrobianos al interior de las células fagocitarias influyen diversos factores relacionados con el propio fármaco, tales como la temperatura, el pH, la viabilidad de las células y la estructura molecular del antibiótico. Otros factores son, el tipo de célula fagocítica y la concentración extracelular del antibiótico (24).

Sin embargo, la capacidad de los antibióticos para entrar en los fagocitos, no predice exactamente la actividad del fármaco contra organismos intracelulares. La actividad intrafagocítica del antibiótico depende de múltiples factores (25).

- a) la localización intracelular específica y la concentración del antimicrobiano
- b) las propiedades intrínsecas antibacterianas del agente (mecanismo de acción)
- c) el efecto del medio intracelular en la actividad biológica del antibiótico y en la susceptibilidad del microorganismo
- d) la influencia del antibiótico en la función del fagocito (fagocitosis, sistemas microbicidas, etc)

En términos generales, la mayoría de los estudios han señalado que los antibióticos betalactámicos y los aminoglicósidos no pasan ni son activos en el interior de las células fagocitarias. Los macrólidos, aunque se concentran en el interior de los fagocitos, solo son activos a elevadas concentraciones, debido a que se localiza en el fagosoma que tiene un pH ácido. Todas las quinolonas pasan y son activas en el interior del fagocito. Con las tetraciclínas existen pocos estudios de penetración y actividad intrafagocitaria, estos trabajos señalan que penetran pero carecen de actividad intracelular, aunque oxitetraciclina es activa en el interior de los fagocitos. La rifampicina pasa y es muy activa en el interior tanto de PMNs como de macrófagos (1).

3.1.2. Quimiotaxis

Los antibióticos betalactámicos no afectan a la quimiotaxis a niveles terapéuticos

convencionales (26). Las tetraciclinas y los aminoglicósidos parecen inhibir la respuesta quimiotáctica de los leucocitos, este efecto negativo ha sido observado tanto *in vitro* como *in vivo* (1). Los macrólidos (eritromicina y roxitromicina) estimulan la quimiotaxis en respuesta a C5a (27,28). Otros grupos de antibióticos como clindamicina y rifampicina, no han mostrado efecto sobre la quimiotaxis (29).

3.1.3. Fagocitosis y muerte intracelular de los microorganismos.

Los experimentos en los que el antimicrobiano está presente en el medio de incubación de PMNs y bacterias, muestran problemas de interpretación puesto que el efecto del antibiótico puede estar relacionado con su interacción con cualquiera de los componentes que se hallan en el sistema analizado y no necesariamente con la célula fagocítica.

Los antibióticos betalactámicos y eritromicina no afectan la fagocitosis de forma directa. Los datos disponibles sobre la influencia de aminoglicósidos en la fagocitosis son contradictorios y en el caso de clindamicina, no hay suficientes estudios para poder extraer conclusiones. Las tetraciclinas parecen ejercer efectos negativos en la actividad fagocítica de los leucocitos (1).

Cefozidima y cefotaxima incrementan la muerte de S. aureus por PMNs (30). El mecanismo de este sinergismo es diferente para las dos cefalosporinas, cefotaxima incrementó la muerte y la respuesta oxidativa de los PMNs a partículas opsonizadas (S. aureus y zimosan). Estos efectos no se observaron con partículas no opsonizadas. En el caso de cefozidima, el sinergismo bactericida estaba relacionado con la interacción con el sistema independiente de oxígeno de los PMNs.

La rifampicina afecta a la respuesta oxidativa de los PMNs, deprimiendo la producción de superóxido y la quimioluminiscencia de forma dosis dependiente (31). Las ciclinas deprimen varias funciones de los PMNs por mecanismos específicos, el más importante es por quelación de calcio intracelular (32), además las ciclinas pueden influir en la actividad de los PMNs por generación de singletes de oxígeno debidos a la exposición a la luz UV (33) con daño de las estructuras de los PMNs que participan en el estallido respiratorio. Los aminoglicósidos dificultan la actividad candidicida de los PMNs (34). El mecanismo responsable de estos efectos podría estar relacionado con

la inhibición del metabolismo de los fosfoinosítidos.

También se ha descrito sinergismo entre la actividad bactericida de los PMNs y macrólidos como eritromicina, roxitromicina (35) o josamicina (36). El mecanismo de este sinergismo no está claramente demostrado *in vitro* ya que estos compuestos no alteran significativamente la quimiotaxis ni el metabolismo oxidativo a las concentraciones a las que si se incrementa la muerte por PMNs. El incremento de la muerte bacteriana podría estar relacionado con las concentraciones intracelulares de estos fármacos en los fagolisosomas, donde potenciarían los mecanismos bactericidas intrínsecos de las células (37).

Los mecanismos mediante los cuales las fluorquinolonas influyen moderadamente en la respuesta de los PMNs, son desconocidos. Se ha hallado un aumento en la fagocitosis y muerte bacteriana con norfloxacin y pefloxacin, así como la estimulación de la vía hexosa monofosfato con ciprofloxacino y ofloxacino (38).

3.2. Acción indirecta de los antimicrobianos sobre las funciones de los leucocitos PMNs.

3.2.1. Efecto de las concentraciones sub-CMI.

Normalmente la actividad de los antimicrobianos se describe por su capacidad para matar o inhibir el crecimiento de los microorganismos, debido a ello se intentan conseguir concentraciones de antibiótico que excedan la CMI-CMB en el lugar de la infección. Pero las concentraciones de antibiótico, generalmente exceden la CMI, durante limitados períodos de tiempo, después las concentraciones son menores que la CMI (sub-CMIs). Esto es obvio en tejidos, donde las infecciones están localizadas y donde las concentraciones de antibiótico son frecuentemente menores que las halladas en sangre (39).

Las concentraciones sub-CMI tienen distintas actividades en la morfología y fisiología de las bacterias que pueden indirectamente afectar su virulencia y sensibilidad a las células fagocíticas.

La síntesis de factores de virulencia como la proteína M de Streptococcus pyogenes puede ser reprimida cuando la bacteria productora crece con concentraciones subinhibitorias de clindamicina (40). La proteína A puede impedir la opsonización de

estafilococos por suero (41). El incremento en la fagocitosis y muerte de S. aureus puede ocurrir tras la inhibición de la biosíntesis de la proteína A debido a la exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos (clindamicina y ácido fusídico) (13). Otros factores de virulencia cuya expresión puede ser modulada por concentraciones sub-CMI de antibióticos son: el antígeno K y hemolisinas en E. coli (42,43) y la cápsula lipopolisacárida en Bacteroides fragilis y Haemophilus influenzae (44,45,46).

La preincubación con concentraciones sub-CMIs puede provocar modificaciones en la adhesividad (39), en la sensibilidad de las bacterias al suero (47), y también modificaciones en los requerimientos opsonicos (48). Concentraciones subinhibitorias de gentamicina incrementan la fagocitosis de bacterias aerobias por PMNs a través de un mecanismo directo que daña a la bacteria facilitando su opsonización y fagocitosis (52). En un trabajo con dos cepas capsuladas de E. coli, el pretratamiento con concentraciones sub-CMIs de netilmicina elevó tanto el consumo de complemento como la fagocitosis (42).

El pretratamiento con concentraciones sub-CMIs, puede también modificar la sensibilidad a los mecanismos de muerte independientes o dependientes de oxígeno. Se ha observado que después de crecer durante la noche en presencia de concentraciones sub-CMI de ceftriaxona, los filamentos de Klebsiella pneumoniae sufrieron un aumento de sensibilidad a la muerte independiente de oxígeno, como ocurrió también en el caso de S. aureus tratada con ceftriaxona (53). Por el contrario, los filamentos de P. aeruginosa debidos a la exposición a ceftriaxona, mostraron una mayor sensibilidad a la muerte dependiente de oxígeno que las bacterias control no tratadas (54).

Las bacterias preincubadas pueden liberar sustancias capaces de estimular directamente las células fagocíticas (49) o exponer otros antígenos (50).

La filamentación de bacterias Gram-negativas, después de la preincubación con concentraciones sub-CMIs de betalactámicos y fluorquinolonas (16) aumenta la sensibilidad a la actividad de los leucocitos. Las concentraciones subinhibitorias pueden debilitar la integridad de la estructura bacteriana. Esto puede facilitar el acceso de los factores del fagocito a sus dianas en las bacterias tratadas (51).

3.2.1. Efecto PALE

In vitro los antibióticos retrasan el crecimiento y el metabolismo bacteriano durante un período superior al tiempo de exposición al antimicrobiano, este fenómeno es conocido como efecto postantibiótico o PAE (4,55). El término efecto postantibiótico se define como el período de recuperación o la supresión persistente del crecimiento bacteriano tras una breve exposición al antimicrobiano (4).

El PAE parece tener su principal implicación en las pautas de dosificación de antimicrobianos, pero la eficacia terapéutica de los antibióticos depende de la funcionalidad de los mecanismos de defensa del organismo. A este respecto Eagle et al. (56) sugirieron que el efecto postantibiótico puede contribuir a la eficacia de los regímenes de dosis de antibióticos, pero reconocen que los factores del hospedador son cruciales en el intervalo de dosificación del tratamiento.

Los estudios de Alexander y Good (1968) (6) demostraron que la exposición de Staphylococcus aureus a la penicilina y estreptomocina a concentraciones mayores que la CMI aumentaba la capacidad bactericida de los PMNs humanos.

Posteriormente se estableció que un período corto de contacto entre la bacteria y el antibiótico era suficiente para sensibilizar la bacteria a la actividad del leucocito (57). Este incremento observado en la sensibilidad de la bacteria pretratada no podía deberse al antibiótico residual (4), sino a cambios estructurales en la membrana externa de la bacteria inducidos por el antibiótico (58).

Algunos autores postularon que los compuestos que modifican la superficie celular bacteriana serían más apropiados para activar los procesos de fagocitosis y muerte intracelular por los PMNs que aquellos que tenían un locus de actuación subcelular. Sin embargo se habían observado cambios en la permeabilidad de la membrana celular después de la exposición de E. coli a cloranfenicol, inducidos a través de un mecanismo de acción intracelular de este antibiótico. Por tanto este efecto de aumento de sensibilidad no se observaba únicamente con antibióticos que tenían su sitio de acción en la pared, sino también en aquellos con actividad intracelular.

En la situación "in vivo" el tiempo real de contacto de la bacteria con niveles suprainhibitorios de antibiótico, puede ser relativamente corto, sobre todo en una terapia

de dosis seriadas, en la que los niveles de antibiótico descienden por debajo de concentraciones inhibitorias durante una parte del intervalo de dosificación. Exposiciones previas al antimicrobiano durante un breve período de tiempo simulan los niveles de antibiótico alcanzados durante su dosificación.

La exposición de bacterias a altas concentraciones de antimicrobianos durante limitados períodos de tiempo puede afectar su interacción con los leucocitos PMNs.

McDonald et al. (9,59) y Pruul et al. (60,61,19,48) demostraron que los organismos en fase postantibiótica eran más susceptibles a la actividad antibacteriana de los leucocitos humanos. Ellos denominaron a este fenómeno "**PALE**" (**Postantibiotic leukocyte enhancement**).

Con Escherichia coli se ha determinado que los antibióticos que inhiben la síntesis proteica inducen un efecto PALE superior al que producen los antibióticos betalactámicos (9). El pretratamiento de Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes con penicilina G, amoxicilina, eritromicina y clindamicina provoca también un incremento en la sensibilidad a la acción letal de los leucocitos (62).

Este incremento de la susceptibilidad está relacionado con cambios fenotípicos en la bacteria que afectan a la fagocitosis y muerte intracelular.

Diversas propiedades de la estructura superficial bacteriana, importantes en la interacción con los componentes de defensa del huésped, pueden ser alterados por exposición al antibiótico.

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana parece desempeñar un importante papel en la interacción entre bacterias y fagocitos. Se ha demostrado que la asociación bacteria-célula fagocítica disminuye cuando aumentan las propiedades hidrofílicas de la pared celular bacteriana (63). El incremento de la hidrofobicidad de la bacteria expuesta a antibióticos, apoya la hipótesis de que la exposición al antimicrobiano desorganiza las estructuras externas de la pared celular responsables de la resistencia a la fagocitosis por PMNs. Las alteraciones ocasionadas por el antibiótico conducirían a una exposición de los lípidos de la membrana externa, aumentando la hidrofobicidad de la célula bacteriana (48).

Las mutaciones liso-rugosas, que modifican estructuras lipopolisacáridas,

disminuyen la resistencia a la fagocitosis y a la actividad bactericida de extractos de gránulos de leucocitos (19). Se ha demostrado además, que perturbaciones no letales de la membrana externa, de bacterias gram-negativas resistentes al suero, provocan un cambio fenotípico reversible hacia la sensibilidad al suero (61).

Los cambios en la permeabilidad de la membrana externa de E. coli han sido observados después de la exposición a altos niveles de cloranfenicol. La actividad bacteriostática del cloranfenicol está asociada con su interferencia en la síntesis protéica mediante la supresión de la actividad peptidil-transferasa en la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano. Sin embargo, esto no explica su actividad bactericida *in vivo* frente a Haemophilus influenzae, que puede estar relacionada con la desestabilización de la estructura y funcionalidad de la membrana externa bacteriana a través de la incorporación de proteínas incompletas de bajo peso molecular que aumentan su permeabilidad y susceptibilidad a PMNs humanos (61).

La filamentación de bacilos Gram-negativos ha sido puesta de manifiesto en múltiples estudios *in vitro* y constatada en pacientes infecciosos que estaban tratados con antibióticos (15). Cuando la población de bacterias es expuesta a concentraciones de antibiótico iguales o mayores que la CMI, tiene lugar la lisis pero no se produce en toda la población al mismo tiempo. Esto da lugar en muchos casos a una mezcla de filamentos y filamentos lisados. Lorian et al. demostraron que las bacterias expuestas a antibióticos betalactámicos y a aquellos que directa o indirectamente producen una alteración en la síntesis protéica, inducen elongación y algunas veces formas fusiformes en Gram-negativos. Además de su morfología se producen cambios en el peso y en la masa de la bacteria. El estudio de la capacidad bactericida de los PMNs sobre bacilos gram-negativos y sus respectivos filamentos, evaluado como peso de microorganismos muertos/PMNs (16), reveló que los filamentos son significativamente más susceptibles que los bacilos normales a la actividad bactericida de los leucocitos PMNs.

El máximo efecto PALE requiere la participación de anticuerpos y complemento. El requerimiento de anticuerpos indica que el PALE opera a través de la activación de la vía clásica del complemento. La falta de actividad antimicrobiana del suero absorbido en presencia de leucocitos puede ser compensada por una incubación previa de la

bacteria en suero humano normal. Si la unión a anticuerpos antes del tratamiento con el antimicrobiano es eficaz, probablemente el PALE no se debe a un incremento en el consumo de anticuerpos, sino a la exposición de nuevos sitios de unión al anticuerpo debido al pretratamiento (61).

La susceptibilidad a la muerte fagocítica, es modulada a través de mecanismos en gran parte desconocidos.

El incremento en la muerte de estreptococos grupo A por leucocitos, después de una breve exposición a eritromicina, fue dependiente de un aumento en la fagocitosis (18).

Por el contrario, el descenso en la viabilidad de Escherichia coli después de una incubación *in vitro* con cloranfenicol fue relacionado con un aumento en la muerte intracelular (19). Tanto los mecanismos dependientes de oxígeno (19,21), como los independientes (22), se hallan involucrados en el incremento de la muerte intracelular de bacterias dañadas por antibióticos.

Además de estos estudios *in vitro* también se han realizado trabajos utilizando modelos animales que sugieren que el fenómeno PALE podría darse también *in vivo*.

Eagle et al. (66,67) demostraron en ratones que la DL_{50} de estreptococos grupo A y B disminuía de 100 a 1000 veces si los animales eran inoculados con organismos en fase PAE, sin embargo, en este estudio no se determinó qué factor del hospedador era responsable de este efecto.

Gerber y Craig (68) observaron que las bacterias en fase PAE eran eliminadas más rápidamente que las bacterias no tratadas, cuando eran inyectadas en muslos de ratones normales. Estos organismos no eran eliminados si eran inyectados en ratones neutropénicos, y finalmente volvían a crecer cuando el PAE desaparecía.

Estos estudios sugieren que el efecto PALE es también un fenómeno que tiene lugar *in vivo*.

4. ANTIMICROBIANOS

4.1. Propiedades de los antibióticos betalactámicos.

La estructura básica de los antibióticos betalactámicos consiste en un anillo β -lactámico de cuatro miembros que puede existir como un anillo aislado, representados por los monobactámicos, o puede estar unido a un segundo anillo formando una estructura bicíclica como se encuentra en otras clases (69).

La pared celular que envuelve las células bacterianas está formada por peptidoglicano que consta de péptidos de cadena corta que se enlazan y unen a un largo polímero polisacárido constituido por unidades alternas de ácido N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico con uniones de tipo glicosídico β -(1,4), el grupo carboxilo del ácido murámico generalmente está sustituido por una cadena peptídica de aminoácidos D- y L-. Las uniones cruzadas tienen lugar bien directamente (organismos Gram-negativos) o mediante un puente interpeptídico (organismos Gram-positivos) entre el residuo diamino en posición 3 de la cadena peptídica y D-ala en posición 4 de la subunidad peptídica adyacente. En las bacterias Gram-positivas, el peptidoglicano está directamente unido por enlaces covalentes al ácido teicoico o al ácido teicurónico. En las bacterias Gram-negativas, el peptidoglicano está unido de forma covalente a una membrana externa lipoproteica (70).

La unión cruzada con eliminación del D-ala terminal se denomina reacción de transpeptidación, las enzimas que catalizan esta reacción son las principales dianas de los antibióticos β -lactámicos. La eliminación del D-ala terminal es función de las carboxipeptidasas, enzimas también sujetas a la inhibición por β -lactámicos. La transglicosilación que es responsable de la polimerización de la cadena de glicano en peptidoglicano no es sensible a los β -lactámicos (69).

Los antibióticos β -lactámicos, por tanto, interfieren en el paso metabólico final de la formación de la pared celular, quedando por ello, laxa, incompleta y muy susceptible al estallido y ruptura frente a soluciones no isotónicas con las del protoplasma (71).

Las dianas celulares para los antibióticos β -lactámicos son los enzimas que catalizan la síntesis de las uniones cruzadas de peptidoglicano de la pared celular. Estos

enzimas son proteínas fijadoras de penicilina (PBPs). Se han descrito ocho PBPs localizadas en la membrana interna de la pared celular o en la membrana citoplasmática (72).

Los compuestos β -lactámicos tienen diferentes afinidades para varias PBPs y dependiendo de su unión específica a una PBP tienen diferentes efectos sobre las bacterias. La inactivación de algunas PBPs (PBP 1A, 1B, 2 y 3) provoca la muerte de la célula bacteriana. Por el contrario, otras PBPs (PBP 4, 5 y 6) no son esenciales para la viabilidad de la bacteria y su inactivación por moléculas de β -lactámicos no es letal para la bacteria (73,74).

La actividad de los compuestos β -lactámicos se debe a la capacidad de atravesar la pared de la bacteria y así alcanzar un receptor, afinidad por los enzimas implicados en la síntesis de la pared celular (PBPs) (75) y estabilidad frente a las β -lactamasas, enzimas producidas por las bacterias que hidrolizan el enlace amida cíclico del núcleo de la penicilina, lo que conduce a la producción de peniciloatos sin actividad bacteriana.

En los organismos Gram positivos, las β -lactamasas se segregan extracelularmente, mientras que en los Gram-negativos suelen localizarse en el espacio periplásmico de la bacteria. Las β -lactamasas pueden estar codificadas cromosómicamente o por plásmidos de resistencia. Las primeras pueden ser agrupadas en las clases I y II de Richmond que corresponden a las cefalosporinasas y penicilinasas respectivamente; mientras que las segundas pueden agruparse en β -lactamasas de amplio espectro, llamadas tipo TEM y aquellas que hidrolizan más rápidamente oxacilina (OXA 1, 2 y 3), carbenicilina (PSE 1, 2, 3, 4) que corresponden a las clases III y V respectivamente. Estos tipos producen mayor resistencia a penicilinas que a cefalosporinas. Por último, la clase IV de β -lactamasas de amplio espectro, son enzimas codificadas cromosómicamente, por ejemplo, SHV-1 y HMS-1 (76).

4.2. Carbapenemes.

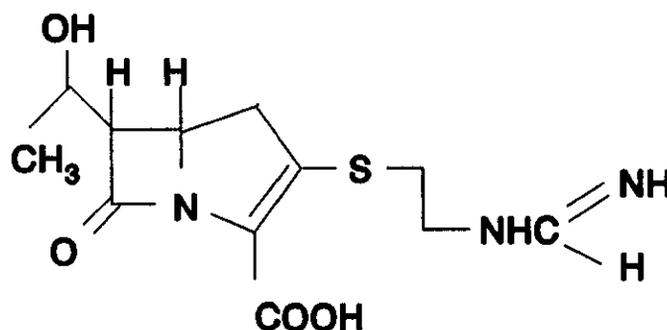
Los carbapenemes son un grupo de antibióticos betalactámicos que tienen un átomo de carbono en lugar del átomo de azufre y una insaturación en el anillo de cinco miembros unido al anillo β -lactámico. El tamaño pequeño y la estructura compacta de estos agentes les permite atravesar fácilmente la pared celular de las bacterias Gram-

negativas.

4.2.1. Imipenem

4.2.1.1. Estructura química

Imipenem (N-formimidoiltienamicina) posee una cadena lateral de hidroxietilo que debido a su configuración trans, que contrasta con la configuración cis de otros β -lactámicos, proporciona resistencia a la hidrólisis por β -lactamasas bacterianas (77).



4.2.1.2. Mecanismo de acción

Imipenem provoca en la célula bacteriana las consecuencias esperadas de un antibiótico β -lactámico, la síntesis de pared celular se interrumpe. Sin embargo, las consecuencias morfológicas de esta inhibición son inusuales, en lugar de filamentos como suele suceder con penicilinas y cefalosporinas, aparecen pequeñas esferas o elipsoides. Estas observaciones sugieren que imipenem actúa sobre una diana distinta. La unión preferente de los β -lactámicos a la PBP 2 da lugar a células redondeadas, por otra parte los agentes que no se unen a PBP 2 pero tienen alta afinidad por PBP 3 inducen largos filamentos (78). Imipenem se une a PBP 2 y PBP 1 (79), esto explica los diferentes efectos morfológicos que produce este agente, y las perturbaciones en la superficie de la célula que conducen a la muerte y lisis.

4.2.1.3. Actividad bactericida

Imipenem es bactericida, tiene una CMB igual o muy similar a la CMI contra varios géneros de organismos (79). Borobio et al. (1981) encontraron en general una relación entre CMI/CMB de una unidad para anaerobios Gram- positivos y cepas de Bacteroides (80). La relación fue independiente del incremento del tamaño de inóculo

(10^3 a 10^7 ufc) y no fue afectada por el medio empleado o su pH. Otros autores (81) hallaron que la CMB excedía la CMI solo en un pequeño número de especies. También demostraron que la adición de suero (más del 75% del medio) no incrementa la CMI o CMB, ellos señalaron que se debía a la baja unión de imipenem a las proteínas del suero. Por otra parte, estudios sobre una gran variedad de aislados clínicos, mostraron que había un pequeño efecto del tamaño del inóculo sobre las concentraciones inhibitorias y que las CMBs no eran mayores de 2 a 4 veces la CMI (82).

4.2.1.4. Resistencia a β -lactamasas

Imipenem induce la producción de β -lactamasas; sin embargo permanece activo contra las bacterias productoras de β -lactamasas. Imipenem es resistente a la mayoría de las β -lactamasas excepto aquellas producidas por Xanthomonas maltophilia y algunas cepas de B. fragilis (83,84).

4.2.1.5. Espectro antimicrobiano

Imipenem tiene un amplio espectro antibacteriano, es bactericida contra la mayoría de las bacterias aerobias Gram-positivas y Gram-negativas y bacterias anaerobias (85). Tiene una excelente actividad contra cocos Gram- positivos incluidos los estreptococos grupo D. Más del 90% de la mayoría de las especies de organismos Gram-negativos son susceptibles, incluyendo aquellos resistentes a otros agentes β -lactámicos y aminoglucósidos (86,87). Imipenem es muy efectivo contra los organismos anaerobios y en general su actividad es comparable a la de metronidazol y clindamicina. Xanthomonas maltophilia generalmente es resistente a imipenem, así como ciertas cepas de Pseudomonas cepacia y Enterococcus faecium (88,89).

4.2.1.6. Farmacocinética

Imipenem tiene propiedades farmacocinéticas muy similares a otros β -lactámicos, penetra bien en lugares distintos del compartimento vascular. Alcanza altos niveles rápidamente en áreas bien irrigadas tales como la cavidad peritoneal y penetra en lugares menos accesibles como en el líquido cerebroespinal en grado similar a otros β -lactámicos (90). La unión a proteínas plasmáticas es de un 20%. La vida media de imipenem es de 1 hora y no se ve modificada cuando se administra imipenem/cilastatina (91). Los niveles máximos en plasma tras la administración intravenosa de 0.5 y 1 g.

de imipenem/cilastatina (las dosis y niveles se refieren exclusivamente al imipenem) son respectivamente de 21 a 58 y 41 a 83 mg/l (92). Imipenem es inactivado en el riñón por una enzima, la dehidropeptidasa I, que no tiene una función fisiológica conocida, mediante apertura del anillo β -lactámico. Cilastatina (L-cisteinil-tio-hexanoato) inhibe la actuación del enzima, por ello la combinación imipenem/cilastatina se emplea en el tratamiento de las infecciones en una relación de peso 1:1 (93). Tanto para imipenem como para cilastatina, la eliminación es renal por filtración glomerular y secreción tubular. Cuando imipenem es administrado solo por vía intravenosa, los niveles excretados en orina son bajos y variables (6 a 38% de la dosis) entre individuos (94), mientras que si se administra con cilastatina en igual cantidad (95) la recuperación urinaria es cercana al 70% de la dosis, microbiológicamente activo y sin sufrir cambios.

4.2.1.7. Indicaciones terapéuticas

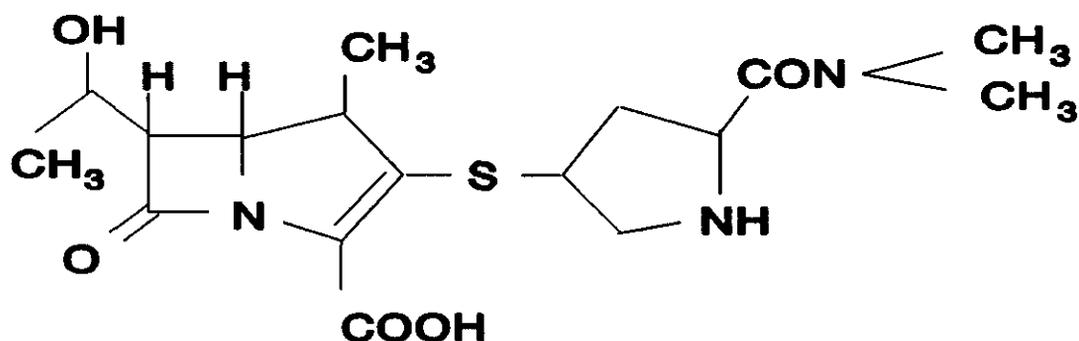
Presenta una eficacia alta en el tratamiento de una amplia variedad de infecciones causadas por bacterias aerobias Gram-positivas o Gram-negativas y anaerobios, así como aquellas debidas a ambas, tales como infecciones de tejidos blandos, pulmonares, abdominales, ginecológicas y septicemia (96).

4.2.1.8. Reacciones adversas

Las reacciones adversas más comunes son: molestias gastrointestinales (nauseas, vómitos y diarrea), *neuroológicas*, *reacciones alérgicas* y un *transitorio aumento de niveles de enzimas renales* (97).

4.2.2. Meropenem

4.2.2.1. Estructura química



Meropenem es un nuevo antibiótico del grupo carbapenem que tiene en común

con imipenem un alfa-hidroxietil en el átomo de carbono 4, pero difiere en que posee un grupo metilo en el carbono 1 que le proporciona resistencia a la hidrólisis por el enzima renal dehidropeptidasa I (98) debido a ello, los primeros datos farmacocinéticos indican que no parece necesaria la asociación con cilastatina, y una cadena lateral de dimetil-carbamoilpirrolidintio en el carbono 3 (99). Es probable que el sustituyente del carbono 3 explique el aumento de actividad de este agente contra bacterias Gram-negativas (100,101).

4.2.2.2. Mecanismo de acción

Meropenem entra fácilmente en la célula bacteriana e interactúa con las proteínas diana (PBPs) en la membrana citoplasmática causando la muerte celular debido a la interrupción en la síntesis de la pared celular. La afinidad de unión de meropenem a las PBPs de E. coli, P. aeruginosa y S.aureus han sido determinadas. La principal diana de meropenem en E. coli es PBP 2, en P. aeruginosa se une a PBP 3 y PBP 2 (102). En S. aureus la afinidad de unión es muy alta para todas las PBPs excepto para PBP 3, posiblemente debido a una vida media muy corta del complejo meropenem-PBP3. Los cambios morfológicos confirman cuáles son las principales dianas de meropenem, en E. coli produce formas redondeadas mientras que en P. aeruginosa induce filamentación.

4.2.2.3. Actividad bactericida

Las cinéticas de actividad antibacteriana de meropenem han sido estudiadas con aerobios Gram-negativos y Gram-positivos y anaerobios. Las concentraciones de dos a cuatro veces la CMI generalmente son bactericidas dentro de las primeras horas tras añadir el agente. Para un amplio número de cepas la CMB fue igual o doble de la CMI. La presencia de suero humano (10 ó 25 %), y variaciones en el pH del medio de 6,7 u 8, o en el tamaño de inóculo no alteran significativamente la CMI (103).

4.2.2.4. Resistencia a β -lactamasas

Meropenem no es inactivado por β -lactamasas cromosómicas o plasmídicas, incluyendo los enzimas que inactivan cefalosporinas de 3^a generación. La única β -lactamasa que destruye a meropenem, así como a imipenem y otros agentes tales como ceftazidima y cefotaxima se halla en Xanthomonas maltophilia (101). Tiene menos

potencial que imipenem para inducir β -lactamasas tipo I pero mayor potencial que ceftazidima.

4.2.2.5. Espectro antimicrobiano

Meropenem posee un amplio espectro de actividad contra aerobios y anaerobios incluyendo estafilococos, estreptococos β -hemolíticos, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria sp., enterobacterias y Pseudomonas sp., Acinetobacter sp., Bacteroides sp., Clostridium sp., Peptostreptococcus sp. Comparado con imipenem, meropenem fue más activo contra bacterias Gram-negativas, en enterobacterias es 4-8 veces superior a imipenem (104), contra Pseudomonas aeruginosa meropenem es también más activo que imipenem (2-4 veces), por el contrario imipenem es más activo frente a Gram-positivos. La actividad de los dos antibióticos contra anaerobios es similar y al igual que imipenem es inactivo en Xanthomonas maltophilia, SAMR y E. faecium (98).

4.2.2.6. Farmacocinética

La penetración de meropenem en fluidos inflamados es muy rápida (105) y la unión a proteínas plasmáticas es bastante baja (2%). La vida media en plasma es, como en el caso de imipenem, de aproximadamente 1 hora (0.98 horas). Tras una inyección intravenosa durante 5 minutos de 1 mg de meropenem sódico disuelto en 20 ml. de agua, se alcanza una concentración pico en plasma de 23.6 $\mu\text{g/ml}$ (105). La farmacocinética de imipenem después de una administración intravenosa en combinación con cilastatina es bastante similar a la observada después de una administración intravenosa de meropenem solo. Esto confirma la estabilidad de meropenem a la enzima renal dehidropeptidasa I. La eliminación, igual que imipenem, es renal por filtración glomerular y secreción tubular. La recuperación urinaria de meropenem es del 75% de la dosis administrada. Meropenem no parece necesitar la combinación con un inhibidor de la DHP-I, como cilastatina para alcanzar altas concentraciones urinarias, la mayor parte se elimina como meropenem (70%) y el resto como su metabolito ICI 213,689 de anillo abierto.

4.2.2.7. Indicaciones terapéuticas

Meropenem posee un elevado nivel de actividad contra una amplia variedad de

patógenos bacterianos, miembros de la familia Enterobacteriaceae, Staphylococcus sp. (excepto cepas meticilina-resistentes) y Bacteroides fragilis son inhibidas por bajas concentraciones. Es más activo que imipenem, gentamicina y amikacina, contra Pseudomonas aeruginosa (106), la alta actividad de este agente contra cepas de P.aeruginosa productoras de β -lactamasas es particularmente interesante.

Los estudios farmacológicos y clínicos deberán establecer la utilidad clínica de este nuevo agente, especialmente para el tratamiento de infecciones urinarias.

4.2.2.8. Reacciones adversas

La escasa información farmacocinética indica que meropenem es bien tolerado (107) y que puede ser administrado sin un inhibidor del enzima DHP-I. Los estudios iniciales también indican que los potenciales nefrotóxicos y neurotóxicos de meropenem son menores que los de imipenem.

4.3. Cefalosporinas.

Las cefalosporinas son antibióticos betalactámicos, bactericidas, de amplio espectro y escasa toxicidad lo que las hace ser muy utilizadas en la práctica médica. Están formadas por un anillo betalactámico unido a otro de dihidrotiazina. En contraste con las penicilinas la molécula de cefalosporina tiene más lugares para su potencial manipulación, además, el núcleo de las cefalosporinas es inherentemente más resistente a las betalactamasas que el de las penicilinas (108). De cualquier forma, la producción de betalactamasas es el principal mecanismo responsable de la inactivación de cefalosporinas.

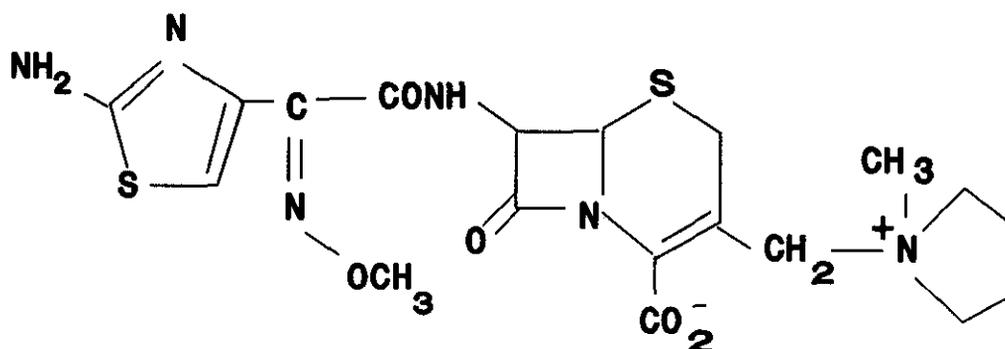
4.3.1. Cefepime

4.3.1.1. Estructura química

Cefepime es una cefalosporina metoxiimino aminotiazolil de cuarta generación, contiene un grupo metil-pirrolidino en la posición 3 de la fracción dihidrotiazina del núcleo cefem, lo que le permite penetrar a través de los canales de las porinas de las bacterias Gram-negativas, más rápidamente que otras cefalosporinas (109).

4.3.1.2. Mecanismo de acción

Se ha observado que la más importante diana de cefepime es Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa es la PBP 3. Cefepime también se une con mucha afinidad



a la PBP 2 de E. coli. Cuando la concentración de antibiótico se halla cerca de la CMI de E. coli, se observa la formación de filamentos bacterianos (110). Por otra parte, la presencia en la estructura de cefepime de una cadena lateral en la posición 3 del anillo cefalosporámico con una carga positiva, le confiere un incremento en el grado de permeabilidad (111), que le permite acceder más fácilmente al espacio periplásmico de la bacteria Gram-negativa, donde ejerce su acción uniéndose a las PBPs.

4.3.1.3. Actividad bactericida

La actividad bactericida de cefepime ha sido confirmada por los bajos valores de la concentración mínima inhibitoria y los resultados de las curvas de letalidad contra cepas productoras de diferentes β -lactamasas (112). La variación en el pH, tipo de medio, tamaño de inóculo y adición de suero humano en el medio, no alteró la actividad de cefepime con aislados clínicos de E. coli, Klebsiella pneumoniae y P. aeruginosa (113).

4.3.1.4. Resistencia a β -lactamasas

Cefepime tiene actividad ante microorganismos productores de betalactamasas frente a los que muchas cefalosporinas se mostraban poco efectivas, comprobándose su efectividad contra bacterias que tienen des-reprimido el gen constitutivo productor de betalactamasas. También se observa una escasa reducción de actividad frente a cepas bacterianas con genes que codifican para la producción de elevados niveles de betalactamasas, ello se debe a la resistencia a la hidrólisis por las betalactamasas que le confiere su grupo iminometoxi y a la baja afinidad por estas enzimas (114,115).

4.3.1.5. Farmacocinética

De la administración vía intravenosa de 1 gr de cefepime fueron determinados los siguientes parámetros bioquímicos: la concentración máxima de antibiótico en suero correspondía a 70 mg/l, la vida media en suero a 2,2 horas, y la unión a proteínas plasmáticas era del 19% (116). Esta cefalosporina es escasamente metabolizada en el organismo, siendo el 80% de la dosis administrada recuperada sin cambios en la orina (117). La vía más importante de eliminación es a través de los riñones, por filtración glomerular (118).

4.3.1.6. Espectro antimicrobiano

Cefepime es altamente activo "in vitro" contra enterobacterias. También es activo frente a Pseudomonas aeruginosa aunque algunas cepas con resistencia a betalactámicos no mediada por plásmidos son a veces menos sensibles. Su actividad varía frente a otras especies de Pseudomonas. Haemophilus influenzae es muy sensible a cefepime. Campylobacter coli/jejuni son normalmente sensibles. Tiene buena actividad frente a Staphylococcus aureus y estafilococos coagulasa negativos, Staphylococcus haemolyticus esta en el límite de sensibilidad. Todos los estreptococos son sensibles excepto los Enterococcus spp y Streptococcus pneumoniae muy resistentes a penicilina. Se muestran resistentes también Bacteroides fragilis, B. oralis, Clostridium difficile y algunos otros clostridium aunque es activo ante otros anaerobios.

4.3.1.7. Indicaciones terapéuticas

Esta indicado en el tratamiento de neumonias, bronquitis, e infecciones del tracto urinario, también se han llevado a cabo estudios satisfactorios en el tratamiento de meningitis en modelos animales como en ratas.

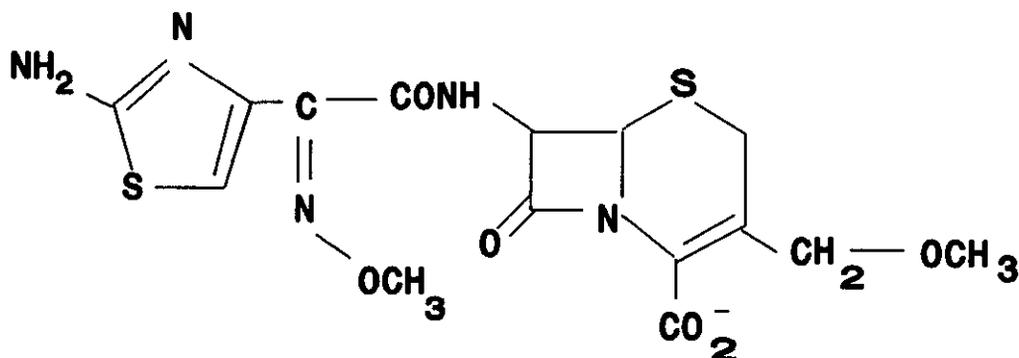
4.3.1.8. Reacciones adversas

Se han descrito cefaleas, pruritos, diarreas y aumento de transaminasas en sangre.

4.3.2. Cefpodoxima

4.3.2.1. Estructura química

Cefpodoxima proxetil es una cefalosporina metoxiimino aminotiazolil de tercera generación cuyo radical carboxílico del núcleo cefem ha sido esterificado con un grupo



isopropiloxicarboniloxi etilo con el fin de permitir su absorción tras la administración oral. La cefpodoxima libre es la que posee la actividad antibiótica, siendo liberada por su hidrólisis del ester (119).

4.3.2.2. Mecanismo de acción

Cefpodoxima como los otros antibióticos betalactámicos penetra a través de los poros de la pared bacteriana y se fija sobre las PBPs, inhibiendo los procesos de síntesis de dicha pared asociados a la morfología y/o a la división celular, y produciendo la destrucción del microorganismo, induciendo además en las bacterias Gram-positivas la activación de enzimas autolíticas (autolisinas).

Cefpodoxima ejerce su acción por inhibición de las PBPs, en concreto sobre la PBP 3 de *E. coli* por la que presenta la máxima afinidad, siendo la única PBP que se satura a la CMI. Este mecanismo de acción explica su actividad antibacteriana al inhibir la PBP responsable de la formación del septo. El bloqueo de esta enzima conduce a la filamentación.

4.3.2.3. Actividad bactericida

Cefpodoxima es bactericida a una concentración igual a la CMI para cepas de *E. coli*, productoras o no productoras de β -lactamasas, y *K. pneumoniae* y de cuatro veces mayor que la CMI para *S. marcescens*, con *S. aureus* la relación CMB:CMI es mucho mayor (120). La actividad de cefpodoxima in vitro es poco afectada por la adición de suero, el tipo de medio de cultivo empleado, aunque un incremento del tamaño de inóculo mayor de 10^6 ufc/ml, reduce la potencia del antibiótico contra cepas

de enterobacterias productoras de β -lactamasas (121).

4.3.2.4. Resistencia a β -lactamasas

Cefpodoxima presenta una buena estabilidad en presencia de los principales tipos de betalactamasas (122), y es de 4 a 16 veces más activa que amoxicilina/ácido clavulánico, cefaclor y cefuroxima frente a diversos tipos de enterobacterias productoras de betalactamasas.

4.3.2.5. Espectro antimicrobiano

Cefpodoxima tiene actividad bactericida frente a la gran mayoría de patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, sobre todo frente a los causantes de infecciones del tracto respiratorio y urinario.

Muestra gran actividad frente a enterobacterias como Escherichia coli, Proteus spp y Citrobacter spp aunque tiene CMI elevadas para Klebsiella spp y especies productoras de cefalosporinasa clase I tales como Enterobacter spp, Serratia spp y Morganella spp (123).

Es muy activa frente a Haemophilus influenzae. Muestra buena actividad ante Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes y frente a estreptococos betahemolíticos de los grupos B, C y G. Presenta también actividad a concentraciones terapéuticas ante Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis. Son especies resistentes Pseudomonas aeruginosa y otras especies de Pseudomonas.

4.3.2.6. Farmacocinética

La mitad de la dosis de cefpodoxima administrada alcanza la circulación sistémica. El fármaco es absorbido rápidamente alcanzando una concentración máxima de 1,4 mg/l a las dos horas de la administración de una única dosis de 100 mg y tiene una vida media en suero de 2,11 horas (119). Cefpodoxima penetra bien en los tejidos del tracto respiratorio alto y bajo, los parámetros de penetración del antibiótico a través de la barrera hematoencefálica en ausencia de inflamación, no han sido determinados en humanos, aunque en ratas el paso es escaso. Cefpodoxima se metaboliza en muy poca cantidad en el organismo. Más del 90% del volumen total de cefpodoxima recogido en orina es excretado dentro de las 12 horas siguientes a la administración del fármaco. En la eliminación del antibiótico esta implicada la secreción tubular.

4.3.2.7. Indicaciones terapéuticas

Esta indicado en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas y bajas causadas por gérmenes sensibles a la cefpodoxima, en concreto: amigdalitis y faringitis, sinusitis aguda, bronquitis purulenta aguda, neumonía bacteriana, exacerbación de bronquitis crónica obstructiva, particularmente durante la crisis de repetición.

4.3.2.8. Reacciones adversas

Esencialmente pueden aparecer trastornos digestivos, cefaleas, manifestaciones alérgicas, alteraciones hepato-biliares: elevación moderada y transitoria de transaminasas GOT, GPT y de fosfatasa alcalina, manifestaciones renales: ligero aumento de la urea sanguínea y creatinemia, alteraciones hematológicas: trombocitosis, trombocitopenia, leucopenia y eosinofilia aunque estas son bastante raras.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Microorganismos.

Escherichia coli ATCC 25922 y Staphylococcus aureus ATCC 25923. Las cepas se conservaron en agar Müller-Hinton (OXOID) a 0 °C, llevándose a cabo subcultivos en medio fresco cada 2-3 días.

1.2. Antimicrobianos

Imipenem, suministrado por Merck, Sharp & Dohme, potencia 964 µg/mg.

Meropenem, suministrado por ICI Pharmaceuticals, potencia 864 µg/mg.

Cefepime, suministrado por Bristol-Myers Squibb, potencia 825 µg/mg.

Cefpodoxima, suministrado por Roussel Uclaf, potencia 941 µg/mg.

Las soluciones *stock* de antibiótico se prepararon a partir de polvo valorado y se almacenaron en viales a -20 °C hasta su utilización, se desechó el antibiótico sobrante de los viales una vez descongelados.

1.3. Suero y leucocitos polimorfonucleares.

1.3.1. Obtención del suero humano.

El *pool* de suero humano normal fue obtenido a partir de sangre venosa de donantes sanos que no estaban tomando medicación. La sangre se recogió en tubos de vidrio estériles y se dejó coagular a temperatura ambiente; tras retirar el coágulo se centrifugó durante veinte minutos a 1.100xg. Se mezclaron los distintos sueros y se envasaron en alícuotas de 1 ml, que se congelaron a -30 °C. La cantidad que se iba a utilizar se descongelaba y el sobrante era desechado.

1.3.2. Obtención, cómputo y viabilidad de los leucocitos polimorfonucleares.

1.3.2.1. Obtención de leucocitos PMNs.

El método utilizado para la extracción de los leucocitos PMNs humanos está basado en el descrito por Paul Eggleton et al. (124). La sangre fue extraída de voluntarios sanos que no estaban tomando medicación, y anticoagulada en tubos de etilendiaminotetraacético (EDTA) potásico (1.5 mg/l). Un volumen de 5 ml de sangre se añadió a un tubo cónico de poliestireno (25 mm x 90 mm) que contenía 16 ml de cloruro amónico, frío (4 °C) y a pH 7.2. La mezcla se mantuvo en baño de hielo

durante 15 minutos con el fin de producir la lisis de eritrocitos. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 160xg durante 10 minutos. El sobrenadante se extrajo con micropipeta y el sedimento de células blancas se resuspendió nuevamente en 16 ml de cloruro amónico repitiendo el proceso.

Tras la segunda centrifugación el sedimento se resuspendió en 5 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin calcio ni magnesio, permaneciendo en baño de hielo hasta el término de la preparación del inóculo bacteriano.

Se procedió a la tercera y última centrifugación (160xg, 10 minutos); el sedimento final de leucocitos se resuspendió en 1 ml de HBSS enriquecida con un 0.1% de gelatina.

1.3.2.2. Cómputo celular.

La determinación del número de leucocitos se realizó con la ayuda de microscopio óptico en cámara de Neubauer. Se depositó un volumen en la cámara de 0.2 ml de una dilución 1:10 de la suspensión leucocitaria.

Se consideraron los siguientes aspectos:

1. Número de leucocitos contados: es la media del número de PMNs en los cuatro cuadrantes de la parte superior de la cámara y de los cuatro cuadrantes de la parte inferior de la cámara.

2. Corrección de volumen: considerando que cada cuadrante de la cámara tiene unas dimensiones de 1x1x1 y por tanto un volumen de 0.1 mm³, como los leucocitos han sido contados en los cuatro cuadrantes, el volumen total considerado es 0.4 mm³. Para obtener un volumen de 1 mm³ debe multiplicarse 0.4 por 2.5. Por tanto, 2.5 es el factor de corrección de volumen.

3. Corrección de dilución: debido a que las células habían sido diluidas al 1/10, el factor de corrección de la dilución será igual a 10.

4. Cómputo final: $\text{leucocitos/mm}^3 = n^\circ \text{ de leucocitos contados} \times \text{corrección de volumen} \times \text{corrección de dilución}$.

Para referir el número de PMNs en número de células por ml, el resultado de la operación anterior lo multiplicamos por 1.000.

1.3.2.3. Viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó, por exclusión del colorante vital azul tripano (R.A.L. Ugine-Kuhlmann) al inicio y final del experimento. Un volumen de la suspensión celular, se mezcló con un volumen igual de azul tripano al 0.4%. Pasados tres minutos, la reacción se detuvo añadiendo formaldehído al 10%. Se tomó una alícuota de la mezcla y se llenaron las dos partes de la cámara de Neubauer, procediéndose al recuento celular con microscopio óptico (40x). Se efectuó el recuento de leucocitos viables y leucocitos totales. Las células no viables presentan el núcleo teñido de azul.

El resultado expresado en porcentaje de células viables se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ células viables} = \frac{\text{PMNs viables}}{\text{PMNs totales}} \times 100$$

Todos los experimentos de este trabajo fueron realizados con una viabilidad superior al 95%.

2. MÉTODOS

2.1. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se calcularon por el método de macrodilución en caldo Müller-Hinton (125). La CMI se definió como la mínima concentración de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento visible (turbidez) de la bacteria en comparación con el tubo control.

2.2 Estudio del Efecto Postantibiótico Leucocitario (PALE).

2.2.1. Preparación del inóculo.

El día anterior al del experimento se preparó un inóculo de la bacteria en caldo Müller-Hinton. Se incubó en estufa a 37 °C durante toda la noche. Las bacterias en fase logarítmica se prepararon por dilución en caldo Müller-Hinton a partir del cultivo *overnight*. Se incubaron en baño de agitación a 37 °C hasta alcanzar un valor de absorbancia medido con espectrofotómetro a 580 nm de luz visible de 0.3 para E. coli y 0.25 para S. aureus, lo que supone aproximadamente 10⁸ UFC/ml.

2.2.2 Tratamiento antimicrobiano.

Alícuotas de 0.2 ml del cultivo bacteriano se añadieron a tubos que contenían caldo Müller-Hinton con antimicrobiano a una concentración de cuatro veces la CMI correspondiente a la cepa utilizada en cada caso, resultando un volumen final de 2 ml. Se incluyó un tubo con bacterias y medio Müller-Hinton sin antimicrobiano como control.

Las bacterias se expusieron al antimicrobiano durante 10 minutos, incubándose en baño de agitación (52 U) a 37 °C.

Al final del período de incubación, se añadieron 8 ml de caldo fresco para diluir el antimicrobiano del medio y centrifugamos a 2.000xg durante 10 minutos para eliminarlo. Se extrajo el sobrenadante cuidadosamente y el sedimento bacteriano se resuspendió en HBSS-gelatina hasta una concentración de 10⁸ UFC/ml.

2.2.3. Estudio del efecto antimicrobiano en el crecimiento.

Muestras de 0.2 ml de bacterias tratadas con los distintos antimicrobianos y de bacterias control no tratadas, se añadieron a tubos de poliestireno que contenían HBSS-gelatina y se incubaron durante tres horas a 37 °C en baño de agitación (52 U). A intervalos de una hora, se tomaron alícuotas de las bacterias tratadas y de las bacterias control para determinar su cinética de crecimiento, expresada en UFC/ml. Para ello, se hicieron diluciones decimales de las distintas mezclas en agua estéril a pH 10.8 (3) y se sembraron muestras en placas de agar Müller-Hinton que se incubaron a 37 °C, durante 18-24 horas. Se contabilizó el número de UFC/placa y se determinó el log₁₀ UFC/ml para representar gráficamente el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo.

Se midió el efecto antibacteriano del antimicrobiano calculando la diferencia entre el log₁₀ UFC/ml de las bacterias control y el log₁₀ UFC/ml de las bacterias tratadas a lo largo del tiempo.

2.2.4. Estudio de la sensibilidad al suero.

Estudiamos si la presencia del suero humano normal (SHN) a una concentración del 20% respecto del volumen total, puede influir en el crecimiento de bacterias pretratadas con antimicrobiano y en el de bacterias control sin pretratar. Para ello, se tomaron alícuotas de 0.2 ml de HBSS-gelatina suplementado con 20% de suero humano

normal. Los tubos con las mezclas se incubaron a 37 °C en baño de agitación (52 U) durante tres horas. A intervalos de una hora, se tomaron alícuotas de las bacterias tratadas y de las bacterias control para determinar su cinética de crecimiento según el número de UFC/ml. Para ello, se hicieron diluciones decimales de las distintas mezclas en agua estéril a pH 10.8 (126) y se sembraron muestras en placas de agar Müller-Hinton que se incubaron a 37 °C, durante 18-24 horas. Se contabilizó el número de UFC/placa y se determinó el \log_{10} UFC/ml para representar gráficamente el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo.

El efecto del suero se midió calculando la diferencia entre el \log_{10} UFC/ml de las bacterias control y el \log_{10} UFC/ml de las bacterias tratadas ambas en presencia de suero, a lo largo del tiempo.

2.2.5. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs en la fase postantibiótica. PALE.

La actividad bactericida de los leucocitos PMNs se estudió incubando alícuotas de 0.2 ml de bacterias pretratadas y de bacterias control con leucocitos PMNs, en HBSS-gelatina, en presencia y ausencia del 20% de SHN. El volumen total de los tubos fue de 2 ml y la relación final de bacterias a leucocitos fue de 10:1. Para realizar el cómputo de microorganismos viables, a intervalos de una hora, se tomaron alícuotas de las distintas mezclas y se añadieron a tubos que contenían agua estéril a pH 10.8 con el fin de romper los PMNs y liberar las bacterias que permanecían viables a pesar de haber sido fagocitadas (126).

Se realizaron diluciones decimales y se sembraron muestras en placas de agar Müller-Hinton, incubándose a 37 °C durante 18-24 horas. El número de UFC/ml de representó en unidades logarítmicas a lo largo del tiempo.

La muerte fagocítica se midió calculando el número de bacterias muertas por el PMN respecto del control sin PMN, tanto para el control como para las pretratadas, a lo largo del tiempo y se expresó en términos de porcentaje.

El efecto PALE se midió estableciendo la relación entre la fagocitosis de las bacterias tratadas respecto a la fagocitosis de las bacterias control.

Los ensayos se repitieron cinco veces para cada antimicrobiano.

2.3. Estudio de la actividad bactericida de leucocitos PMNs en presencia continua de antimicrobianos.

2.3.1. Preparación del inóculo.

El inóculo bacteriano fue preparado de idéntica manera que en el apartado 2.2.1. del estudio del Efecto Postantibiótico Leucocitario (PALE).

2.3.2. Estudio de las curvas de letalidad de E.coli y S. aureus.

Alícuotas de 0.2 ml de cultivo bacteriano con un número de 10^8 UFC/ml, se añadieron a tubos que contenían caldo Müller-Hinton en un volumen final de 2 ml, para seguir el mismo proceso de: incubación en baño de agitación (52 U) a 37 °C durante 10 minutos, dilución y posterior centrifugación, con el fin de poder establecer comparaciones entre las cinéticas de crecimiento en fase postantibiótica y en presencia continua de antibiótico.

Se extrajo el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en HBSS-gelatina hasta una concentración de 10^8 UFC/ml. Muestras de 0.2 ml de la suspensión bacteriana fueron añadidas a tubos de poliestireno que contenían HBSS-gelatina suplementado con un 20% de SHN, y antimicrobiano a una concentración de 4 y 1/2 CMI correspondiente a la cepa utilizada en cada caso, resultando un volumen final de 2 ml. Se incluyó como control un tubo con HBSS-gelatina y 20% de suero y sin antimicrobiano, al que fue añadido el mismo volumen de suspensión bacteriana. Los tubos se incubaron durante tres horas a 37 °C en baño de agitación (52 U). A intervalos de una hora se tomaron alícuotas de las bacterias tratadas y de las bacterias control para determinar su cinética de crecimiento, expresada en UFC/ml. Fueron realizadas diluciones decimales de las distintas mezclas en agua estéril a pH 10.8 (126) y se sembraron muestras en placas de agar Müller-Hinton que se incubaron a 37 °C, durante 18-24 horas. Se contabilizó el número de colonias en cada placa y se determinó el \log_{10} UFC/ml para representar gráficamente el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo.

2.3.3. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs en presencia continua de antimicrobianos.

Fueron incubadas alícuotas de 0.2 ml del cultivo bacteriano (10^8 UFC/ml) con leucocitos PMNs en HBSS-gelatina suplementada con un 20% de SHN y antimicrobiano

a una concentración de 4 y 1/2 CMI, en un volumen total de 2 ml. Como control fue incluido un tubo con leucocitos PMNs en HBSS-gelatina con un 20% de SHN y sin antimicrobiano, al que le fue añadido 0.2 ml de la suspensión bacteriana. La relación final de bacterias a leucocitos fue de 10:1.

Para realizar el cómputo de microorganismos viables, a intervalos de una hora, se tomaron alícuotas de las distintas mezclas y se añadieron a tubos que contenían agua estéril a pH 10.8 con el fin de romper los PMNs y liberar las bacterias que permanecían viables a pesar de haber sido fagocitadas (126).

Se realizaron diluciones decimales y se sembraron muestras en placas de agar Müller-Hinton, incubándose a 37 °C durante 18-24 horas. El número de UFC/ml de representó en unidades logarítmicas a lo largo del tiempo.

La muerte fagocítica se midió calculando el número de bacterias muertas por el PMN respecto del control sin PMN, tanto para el control como para las incubadas con 1/2 y 4xCMI, a lo largo del tiempo y se expresó en términos de porcentaje.

Los ensayos se repitieron cinco veces para cada antimicrobiano.

2.4. Métodos de cálculo estadístico.

Los estudios estadísticos realizados fueron:

1. Estudio descriptivo del crecimiento bacteriano calculando la media aritmética y la desviación estándar de los resultados obtenidos en cada caso.

2. Estudio mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar la significación de los resultados. Las diferencias se consideraron significativas en los casos en los que la probabilidad de que las diferencias se debieran al azar fuera $p < 0.05$ (127).

RESULTADOS

1. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI's).

La CMI se consideró como la concentración menor de antibiótico capaz de impedir el crecimiento visible de la bacteria. Las CMI's obtenidas para E. coli ATCC 25922 y S. aureus ATCC 25923 se reflejan en la tabla 1.

<u>Antimicrobiano</u>	<u>CMI (mg/l)</u>	
	<u>E. coli</u>	<u>S. aureus</u>
Imipenem	0.25	0.03
Meropenem	0.06	0.25
Cefepime	0.03	1.00
Cefpodoxima	0.25	1.00

2. ESTUDIO DEL EFECTO POSTANTIBIÓTICO LEUCOCITARIO.

2.1. Estudio del pretratamiento antimicrobiano sobre el crecimiento bacteriano.

2.1.1. Efecto sobre el crecimiento de E. coli.

2.1.1.1. Efecto de imipenem.

El tratamiento de E. coli con 4xCMI de imipenem durante 10 minutos, no produjo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en su cinética de crecimiento respecto del control a lo largo de todo el ensayo, Figura (1.a.). El efecto antimicrobiano del tratamiento con imipenem durante las tres horas del ensayo se recoge en la tabla 2.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.86 ± 0.17	0.81 ± 0.10
2	1.15 ± 0.10	0.98 ± 0.13
3	1.34 ± 0.16	1.25 ± 0.12

Tabla 2. Efecto del pretratamiento con imipenem en la cinética de crecimiento de E.coli. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.1.2. Efecto de meropenem.

La curva de crecimiento de E. coli después de una exposición durante diez minutos a meropenem (4xCMI) no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la curva de crecimiento de E. coli no expuesto al antimicrobiano, (figura 2.a.). La tabla 3 muestra el efecto antibacteriano.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.86±0.17	0.80±0.13
2	1.15±0.10	1.07±0.10
3	1.34±0.16	1.35±0.15

Tabla 3. Efecto del pretratamiento con meropenem en la cinética de crecimiento de E.coli. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.1.3. Efecto de cefepime

El tratamiento de E. coli con cefepime (4xCMI) durante 10 minutos, no influyó en la cinética de crecimiento bacteriano. El análisis estadístico señaló que las curvas de crecimiento de bacterias tratadas con el antimicrobiano y bacterias control, sin tratamiento no eran significativamente diferentes ($p < 0.05$), (figura 3.a.). El efecto antibacteriano se refleja en la tabla 4.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.86±0.17	0.78±0.12
2	1.15±0.10	1.17±0.12
3	1.34±0.16	1.31±0.15

Tabla 4. Efecto del pretratamiento con cefepime en la cinética de crecimiento de E.coli. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.1.4. Efecto de cefpodoxima

Las cinéticas de crecimiento de E. coli control (sin tratamiento antimicrobiano) y de E. coli tratado con cefpodoxima, no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Por tanto, la exposición de E. coli durante 10 minutos con cefpodoxima (4x CMI), no alteró su cinética de crecimiento, (figura 4.a.). La tabla 5 muestra el efecto antibacteriano.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.86 ± 0.17	0.89 ± 0.05
2	1.15 ± 0.10	1.07 ± 0.12
3	1.34 ± 0.16	1.26 ± 0.09

Tabla 5. Efecto del pretratamiento con cefpodoxima en la cinética de crecimiento de E.coli. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.2. Efecto sobre el crecimiento de S. aureus.

2.1.2.1. Efecto de imipenem.

El tratamiento con 4x CMI de imipenem durante 10 minutos produjo diferencias significativas acusadas en el crecimiento de S. aureus pretratado respecto del control, (figura 5.a.). La tabla 6 muestra el efecto antibacteriano:

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.41 ± 0.13	-0.49 ± 0.07
2	0.65 ± 0.11	-0.32 ± 0.11
3	0.92 ± 0.11	0.11 ± 0.13

Tabla 6. Efecto del pretratamiento con imipenem en la cinética de crecimiento de S.aureus. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.2.2. Efecto de meropenem.

El tratamiento de S. aureus con 4xCMI de meropenem, durante 10 minutos, alteró significativamente la cinética de crecimiento de bacterias tratadas respecto a las bacterias control, (figura 6.a.). La tabla 7 muestra el efecto antibacteriano a lo largo del tiempo.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.41 ± 0.13	-0.58 ± 0.09
2	0.65 ± 0.11	-0.29 ± 0.10
3	0.92 ± 0.11	0.18 ± 0.11

Tabla 7. Efecto del pretratamiento con meropenem en la cinética de crecimiento de S.aureus. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.2.3. Efecto de cefepime.

El tratamiento de S. aureus con 4xCMI de cefepime, produjo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de las bacterias tratadas respecto del control, (figura 7.a.). El efecto antibacteriano se refleja en la tabla 8.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.41 ± 0.13	-0.24 ± 0.15
2	0.65 ± 0.11	0.24 ± 0.11
3	0.92 ± 0.11	0.37 ± 0.07

Tabla 8. Efecto del pretratamiento con cefepime en la cinética de crecimiento de S.aureus. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.1.2.4. Efecto de cefpodoxima.

Las cinéticas de crecimiento de S. aureus expuesto a cefpodoxima y bacterias control, presentan diferencias significativas ($p < 0.05$), lo que indica que una breve

exposición de 10 minutos a cefpodoxima (4xCMI) modifica la cinética de crecimiento de S. aureus, (figura 8.a.). La tabla 9 muestra el efecto antimicrobiano.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	0.41±0.13	-0.23±0.14
2	0.65±0.11	0.03±0.11
3	0.92±0.11	0.28±0.03

Tabla 9. Efecto del pretratamiento con cefpodoxima en la cinética de crecimiento de S.aureus. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2. Efecto del suero en el crecimiento bacteriano.

2.2.1. Efecto del suero en el crecimiento de E. coli.

2.2.1.1. Efecto del suero en el crecimiento de E. coli no pretratado con antimicrobiano.

La presencia de un 20% de suero humano normal en HBSS-gelatina no modificó la cinética de crecimiento de E. coli. Las curvas de crecimiento de bacterias sin pretratamiento antibiótico, en presencia y ausencia de suero, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Tabla 10.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Control+SHN</u>
1	0.86±0.17	0.77±0.06
2	1.15±0.10	1.08±0.13
3	1.34±0.16	1.37±0.08

Tabla 10. Actividad bactericida del suero sobre E. coli. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.1.2. Efecto del suero en el crecimiento de E. coli pretratado con imipenem.

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de bacterias por la acción del suero (20%), tanto si estas estaban tratadas con imipenem o no, (figura 1.b.). Tabla 11.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.77±0.08
2	1.08±0.13	1.11±0.18
3	1.37±0.08	1.23±0.12

Tabla 11. Actividad bactericida del suero sobre E. coli pretratado con imipenem. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.1.3. Efecto del suero sobre el crecimiento de E. coli pretratado con meropenem.

El crecimiento de bacterias expuestas a meropenem, en presencia de suero no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con el crecimiento en ausencia de suero (figura 2.b.). En la tabla 12 se refleja el efecto del suero en la cinética de crecimiento de las bacterias control y tratadas con meropenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.70±0.11
2	1.08±0.13	0.98±0.10
3	1.37±0.08	1.26±0.12

Tabla 12. Actividad bactericida del suero sobre E. coli pretratado con meropenem. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.1.4. Efecto del suero en el crecimiento de E. coli pretratado con cefepime.

La presencia de suero humano normal no modificó la cinética de crecimiento de bacterias pretratadas con cefepime. El crecimiento en presencia de suero, de bacterias controles y bacterias pretratadas no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), (figura 3.b.). La tabla 13 muestra el crecimiento de bacterias control y tratadas con cefepime, en presencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.77 ± 0.06	0.72 ± 0.12
2	1.08 ± 0.13	1.12 ± 0.07
3	1.37 ± 0.08	1.37 ± 0.13

Tabla 13. Actividad bactericida del suero sobre E. coli pretratado con cefepime. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.1.5. Efecto del suero sobre el crecimiento de E. coli pretratado con cefpodoxima.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos no demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las curvas de crecimiento de bacterias pretratadas con cefpodoxima en presencia y ausencia de suero, ni entre el crecimiento de bacterias no tratadas y tratadas con antibiótico, en presencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.77 ± 0.06	0.72 ± 0.12
2	1.08 ± 0.13	1.12 ± 0.07
3	1.37 ± 0.08	1.37 ± 0.13

Tabla 14. Actividad bactericida del suero sobre E. coli pretratado con cefpodoxima. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de

incubación.

2.2.2. Efecto del suero en el crecimiento de S. aureus.

2.2.2.1. Efecto del suero en el crecimiento de S. aureus no pretratado con antimicrobiano.

La cinética de crecimiento en presencia de suero de S. aureus, no muestra diferencias estadísticamente significativas con la cinética de crecimiento de S. aureus en ausencia de suero. Tabla 15.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Control+SHN</u>
1	0.41±0.13	0.44±0.03
2	0.65±0.11	0.67±0.06
3	0.92±0.11	0.88±0.17

Tabla 15. Actividad bactericida del suero sobre S. aureus. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.2.2. Efecto del suero en el crecimiento de S. aureus pretratado con imipenem.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las bacterias pretratadas con imipenem, crecidas en presencia y ausencia de suero, durante las tres horas del experimento.

La presencia de suero actúa antagónicamente con el pretratamiento antimicrobiano y el crecimiento es mayor que el de las bacterias tratadas incubadas en ausencia de suero.

La diferencia en la tasa de crecimiento entre bacterias control y tratadas, en presencia de suero, aun manteniendo diferencias estadísticamente significativas, es menor que entre las bacterias control y tratadas, incubadas sin suero (figura 5.b.).

La tabla 16 refleja el crecimiento de S. aureus tratado y control, incubado en presencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.44±0.03	0.07±0.12
2	0.67±0.06	0.19±0.11
3	0.88±0.17	0.48±0.09

Tabla 16. Actividad bactericida del suero sobre S. aureus pretratado con imipenem. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.2.3. Efecto del suero en el crecimiento de S. aureus pretratado con meropenem.

Igual que en el caso de S. aureus pretratado con imipenem, las cinéticas de crecimiento de bacterias pretratadas con meropenem, en presencia y ausencia de suero, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) durante todo el ensayo. La presencia de suero también actúa de forma antagónica con el pretratamiento antibiótico, de tal forma que las diferencias en la tasa de crecimiento entre bacterias control y tratadas, en presencia de suero, son menores que entre bacterias control y tratadas, incubadas en ausencia de suero (figura 6.b.).

La tabla 17 muestra el crecimiento de S. aureus, control y tratado, en presencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.44±0.03	0.16±0.12
2	0.67±0.06	0.22±0.13
3	0.88±0.17	0.43±0.05

Tabla 17. Actividad bactericida del suero sobre S. aureus pretratado con meropenem. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.2.4. Efecto del suero en el crecimiento de S. aureus pretratado con cefepime.

Las cinéticas de crecimiento de S. aureus, pretratado con cefepime, en ausencia y presencia de suero, muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La tasa de crecimiento bacteriano es mayor en presencia de suero que en ausencia del mismo. Es decir, como en el caso de los carbapenemes, el suero ejerce un efecto antagónico con el pretratamiento antimicrobiano, de forma que no se hallan diferencias en el crecimiento en presencia de suero, de bacterias control y tratadas (figura 7.b.).

La tabla 18 refleja el crecimiento, de bacterias control y tratadas, en presencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.44±0.03	0.44±0.06
2	0.67±0.06	0.67±0.10
3	0.88±0.17	0.86±0.11

Tabla 18. Actividad bactericida del suero sobre S. aureus pretratado con cefepime. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.2.2.5. Efecto en el crecimiento de S. aureus pretratado con cefpodoxima.

Las curvas de crecimiento de S. aureus pretratado con cefpodoxima, en presencia y ausencia de suero, muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las bacterias incubadas con suero, presentan una cinética de crecimiento mayor que S. aureus incubado en ausencia de suero, las cinéticas de crecimiento en presencia de suero, de S. aureus control y tratado con cefpodoxima, no presentan diferencias estadísticamente significativas (figura 8.b.).

La tabla 19 muestra la cinética de crecimiento en presencia de suero, de S.aureus control y pretratado con cefpodoxima.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	0.44±0.03	0.42±0.16
2	0.67±0.06	0.67±0.06
3	0.88±0.17	0.94±0.17

Tabla 19. Actividad bactericida del suero sobre S. aureus pretratado con cefpodoxima. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.3. Actividad de los leucocitos PMNs. P.A.L.E.

2.3.1. Actividad de los leucocitos PMNs frente a E. coli.

2.3.1.1. Actividad de los leucocitos PMN frente a E. coli no pretratado con antimicrobiano.

2.3.1.1.a. Ausencia de suero.

Las cinéticas de crecimiento de bacterias controles, en presencia y ausencia de leucocitos polimorfonucleares presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) a tiempo $t=1$ y $t=2$ horas. La tabla 20 muestra las cinéticas de crecimiento de E. coli en presencia y ausencia de PMN.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Control+PMN</u>
1	0.86±0.17	0.64±0.13
2	1.15±0.10	0.97±0.08
3	1.34±0.16	1.32±0.07

Tabla 20. Fagocitosis y muerte intracelular de E. coli. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.3.1.1.b. Presencia de suero.

El número de bacterias viables en presencia de leucocitos PMNs y suero, fue menor durante todo el tiempo que duró el experimento, que en ausencia de PMNs. La

adición de suero al medio incrementó la muerte fagocítica de las bacterias control con respecto a la hallada en ausencia de suero. La tabla 21 muestra el crecimiento de E. coli en presencia de suero y en presencia de PMNs y suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09
2	1.08±0.13	0.62±0.06
3	1.37±0.08	0.82±0.14

Tabla 21. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, en presencia de suero, de E.coli. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.3.1.2. Actividad de los leucocitos PMNs frente a E. coli pretratado con imipenem.

2.3.1.2.a. Ausencia de suero.

Las curvas de crecimiento de E. coli pretratado con imipenem, en presencia y ausencia de PMNs, son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a lo largo de todo el ensayo (figura 1.a.). El análisis estadístico indicó que el crecimiento de bacterias controles en presencia de PMNs fue diferente del crecimiento de bacterias tratadas también en presencia de PMNs, durante las tres horas del ensayo. La tabla 22 muestra las cinéticas de crecimiento, en presencia de PMNs, de E. coli control y E. coli pretratado con imipenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.64±0.13	0.51±0.18
2	0.97±0.08	0.77±0.06
3	1.32±0.07	0.88±0.05

Tabla 22. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con imipenem. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas

de incubación.

El porcentaje medio, en las tres horas del experimento, de muerte fagocítica de bacterias controles fue del 26.05%, en el caso de las bacterias previamente expuestas al antibiótico fue del 48.52% (los valores se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs) (tabla 24, figura 1.c.).

2.3.1.2.b. Presencia de suero.

Las curvas de crecimiento de *E. coli* pretratado con imipenem, en presencia de PMNs y en presencia de PMNs y suero, mostraron diferencias estadísticamente significativas a tiempo $t=1$ y $t=2$ horas. Es decir, el efecto potenciador del suero sobre la actividad fagocítica se mantuvo hasta el tiempo $t=2$ horas.

La actividad de los leucocitos frente a bacterias expuestas a imipenem se vio incrementada cuando el medio contenía un 20% de suero. Las diferencias entre bacterias control y tratadas en presencia de PMNs y suero, fueron estadísticamente significativas durante las dos primeras horas de incubación (figura 1.b.).

La tabla 23 refleja la cinética de crecimiento, en presencia de PMNs y suero, de bacterias control y pretratadas con imipenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>	<u>Tratado+PMN+SHN</u>
1	0.39±0.09	-0.05±0.06
2	0.62±0.06	0.26±0.04
3	0.82±0.14	0.76±0.10

Tabla 23. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de *E. coli* pretratado con imipenem, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica en presencia de suero de bacterias controles fue del 67.75%, la muerte fagocítica de bacterias pretratadas con imipenem fue del 78.95%. (Tabla 24, figura 1.c.).

La tabla 24 muestra el porcentaje de bacterias muertas debido a la actividad de

los leucocitos PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>		<u>Tratado</u>	
	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>
1	39.75%	66.12%	49.88%	84.87%
2	33.93%	65.33%	38.34%	85.88%
3	4.50%	71.81%	57.34%	66.11%

Tabla 24. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli pretratado con imipenem, en ausencia (-SHN) y en presencia (+SHN) de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.1.3. Actividad de los leucocitos PMNs frente a E. coli pretratado con meropenem.

2.3.1.3.a. Ausencia de suero.

Las cinéticas de crecimiento de E. coli pretratado con meropenem, en presencia y ausencia de PMNs, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), durante el tiempo del ensayo (figura 2.a). Con respecto a bacterias control y pretratadas en presencia de PMNs, el número de bacterias viables fue menor cuando previamente habían sido tratadas con el antibiótico. La tabla 25 refleja el crecimiento bacteriano, en presencia de PMNs, de E. coli control y E. coli pretratado con meropenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.64±0.13	0.47±0.14
2	0.97±0.08	0.86±0.07
3	1.32±0.07	1.03±0.08

Tabla 25. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con meropenem. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica de las bacterias controles fue del 26.05%, mientras que en el caso de bacterias pretratadas con meropenem, la muerte fagocítica fue del 45.57%. (Tabla 27, figura 2.c.).

2.3.1.3.b. Presencia de suero.

Fueron halladas diferencias estadísticamente significativas durante las tres horas del ensayo entre las cinéticas de crecimiento de E. coli pretratado con meropenem, en presencia de PMNs y en presencia de PMNs y suero.

La presencia de suero en el medio provocó un incremento de la actividad bactericida de los leucocitos.

En presencia de PMNs y suero, las diferencias entre bacterias control y tratadas fueron significativas ($p < 0.05$) a tiempo $t=1$ y $t=2$ horas (figura 2.b).

La tabla 26 presenta la cinética de crecimiento de E. coli control y pretratado con meropenem, incubado con PMNs y suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control + PMN + SHN</u>	<u>Tratado + PMN + SHN</u>
1	0.39 ± 0.09	0.01 ± 0.09
2	0.62 ± 0.06	0.34 ± 0.08
3	0.82 ± 0.14	0.73 ± 0.10

Tabla 26. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con meropenem, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica en presencia de suero, de bacterias controles fue del 67.75%, la muerte fagocítica de bacterias pretratadas con meropenem fue del 75.74%. (Tabla 27, figura 2.c).

La tabla 27 muestra el porcentaje de bacterias muertas debido a la actividad de los leucocitos PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>		<u>Tratado</u>	
	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>
1	39.75%	66.12%	52.23%	79.60%
2	33.93%	65.33%	38.34%	77.01%
3	4.50%	71.81%	52.14%	70.60%

Tabla 27. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli pretratado con meropenem, en ausencia (-SHN) y en presencia (+SHN) de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.1.4. Actividad de los leucocitos PMNs frente a E. coli pretratado con cefepime.

2.3.1.4.a. Ausencia de suero.

Las curvas de crecimiento de E. coli pretratado con cefepime, en presencia y ausencia de PMNs, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a tiempo $t=1$ y $t=2$ horas (figura 3.a).

Entre las cinéticas de crecimiento de bacterias expuestas a antibiótico y de bacterias control, ambas en presencia de PMNs, solo se presentaron diferencias estadísticamente significativas durante la primera hora del ensayo.

La tabla 28 muestra el crecimiento de E. coli control y tratado con cefepime, en presencia de PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.64±0.13	0.50±0.07
2	0.97±0.08	0.90±0.12
3	1.32±0.07	1.25±0.13

Tabla 28. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con cefepime. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas

de incubación.

La muerte fagocítica de bacterias pretratadas con cefepime fue mayor que la de bacterias control, 35.16 y 26.05% respectivamente, aunque el incremento no fue tan notable como en el caso de imipenem y meropenem. (Tabla 30, figura 3.c).

2.3.1.4.b. Presencia de suero.

La presencia de suero en el medio de incubación aumentó la actividad leucocitaria. Se hallaron diferencias significativas entre las cinéticas de crecimiento de E. coli pretratado, en presencia de PMNs y en presencia de PMNs y suero, durante todo el ensayo. La capacidad bactericida de los leucocitos PMNs fue mayor frente a bacterias que habían sido expuestas a cefepime, incubadas con suero en el medio, que frente a bacterias controles también incubadas con suero. Las diferencias fueron significativas durante las tres horas (figura 3.b). La tabla 29 muestra la cinética de crecimiento de E. coli control y pretratado con cefepime, en presencia de PMNs y suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>	<u>Tratado+PMN+SHN</u>
1	0.39±0.09	0.14±0.07
2	0.62±0.06	0.39±0.11
3	0.82±0.14	0.63±0.10

Tabla 29. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con cefepime, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica de las bacterias tratadas fue del 78.06% frente al 67.75% de las bacterias control. (Tabla 30, figura 3.c).

La tabla 30 muestra el porcentaje de muerte fagocítica de bacterias control y tratadas con cefepime, en presencia y ausencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>		<u>Tratado</u>	
	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>
1	39.75%	66.12%	46.36%	73.70%
2	33.93%	65.33%	46.30%	81.38%
3	4.50%	71.81%	12.90%	79.11%

Tabla 30. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli pretratado con cefepime, en ausencia (-SHN) y en presencia (+SHN) de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.1.5. Actividad de los leucocitos PMNs frente a E. coli pretratado con cefpodoxima.

2.3.1.5.a. Ausencia de suero.

En ausencia de suero las cinéticas de crecimiento de bacterias pretratadas con cefpodoxima, incubadas con o sin PMNs, muestran diferencias estadísticamente significativas durante las tres horas que dura el ensayo (figura 4.a).

En cuanto a las cinéticas de crecimiento de bacterias controles y pretratadas, en presencia de PMNs, no fueron halladas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), excepto en el tiempo $t=3$ horas.

La tabla 31 muestra el crecimiento de E. coli control y tratado con cefpodoxima, en presencia de PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.64±0.13	0.62±0.15
2	0.97±0.08	0.87±0.10
3	1.32±0.07	1.18±0.09

Tabla 31. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con cefpodoxima. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t

horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica de las bacterias pretratadas con cefpodoxima fue ligeramente superior (33.33%) al de las bacterias control (26.05%), pero el aumento en la actividad leucocitaria debido al pretratamiento antimicrobiano, fue el menor de los cuatro antibióticos estudiados (Tabla 33, figura 4.c.).

2.3.1.5.b. Presencia de suero.

Las cinéticas de crecimiento de las bacterias tratadas con cefpodoxima, en presencia de suero y en presencia de suero y PMNs, muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) durante todo el tiempo que duró el experimento. las diferencias fueron mayores que entre bacterias tratadas incubadas con o sin PMNs (figura 4.b).

Entre las bacterias control y pretratadas con cefpodoxima, incubadas con suero y PMNs, no fueron halladas diferencias estadísticamente significativas, durante todo el ensayo.

La tabla 32 muestra las cinéticas de crecimiento de E. coli incubado con PMNs y suero, tratado y control.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control + PMN + SHN</u>	<u>Tratado + PMN + SHN</u>
1	0.39 ± 0.09	0.35 ± 0.07
2	0.62 ± 0.06	0.57 ± 0.09
3	0.82 ± 0.14	0.75 ± 0.13

Tabla 32. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de E. coli pretratado con cefpodoxima, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica de las bacterias tratadas fue del 68.76% similar al de las bacterias no tratadas: 67.75%. (Tabla 33, figura 3.c.).

La tabla 33 muestra los porcentajes de muerte fagocítica de E. coli tratada y sin tratar con cefpodoxima.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>		<u>Tratado</u>	
	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>	<u>-SHN</u>	<u>+SHN</u>
1	39.75%	66.12%	46.29%	62.84%
2	33.93%	65.33%	36.90%	66.88%
3	4.50%	71.81%	16.82%	76.58%

Tabla 33. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli pretratado con cefpodoxima, en ausencia (-SHN) y en presencia (+SHN) de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.2. Actividad de los leucocitos PMNs frente a S. aureus.

2.3.2.1. Actividad de los leucocitos PMNs frente a S. aureus no pretratado con antimicrobiano.

2.3.2.1.a. Ausencia de suero.

Para entender los resultados obtenidos en la fagocitosis, en ausencia de suero, de S. aureus es esencial tener en cuenta que tanto para las bacterias control como para las bacterias pretratadas con antimicrobiano, la presencia de leucocitos y ausencia de suero determinó un aumento en el número de UFC respecto a los correspondientes controles sin PMN. Este hecho, que se analizará en el capítulo Discusión, no permite presentar los valores de muerte fagocítica en términos de porcentaje y estudiarlos de la misma manera que se hará con los datos de fagocitosis en presencia de suero que sí siguen la misma pauta que en el caso de E. coli. Por ello, los resultados referentes al número de UFC obtenidos en las mezclas C+PMN y AM+PMN se dan en términos de incremento de Log_{10} UFC/ml a lo largo del tiempo.

Las cinéticas de crecimiento de S. aureus en presencia y ausencia de leucocitos PMNs no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La tabla 34 refleja las cinéticas de crecimiento de S. aureus en presencia y ausencia de PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Control+PMN</u>
1	0.41±0.08	0.52±0.15
2	0.65±0.13	0.75±0.12
3	0.92±0.17	0.98±0.09

Tabla 34. Fagocitosis y muerte intracelular de S. aureus. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.3.2.1.b. Presencia de suero.

Entre las cinéticas de crecimiento de bacterias incubadas con suero y bacterias incubadas con PMNs y suero, fueron halladas diferencias estadísticamente significativas, durante todo el ensayo. El número de bacterias viables en presencia de leucocitos y suero, fue menor que en ausencia de PMNs.

La tabla 35 muestra el crecimiento de S. aureus en presencia de suero y en presencia de PMNs y suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05
2	0.67±0.06	0.55±0.06
3	0.88±0.12	0.74±0.14

Tabla 35. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, en presencia de suero, de S.aureus. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

2.3.2.2. Actividad de los leucocitos PMNs frente a S. aureus pretratado con imipenem.

2.3.2.2.a. Ausencia de suero.

Como anteriormente fue mencionado, la presencia de leucocitos en ausencia de suero determinó un aumento en el número de UFC de las bacterias tratadas con imipenem respecto a las bacterias tratadas incubadas sin PMNs (figura 5.a.).

Entre las cinéticas de crecimiento de S. aureus control y tratado con imipenem, en presencia de PMNs, fueron halladas diferencias estadísticamente significativas a tiempos $t=1$, $t=2$ y $t=3$ horas.

La tabla 36 muestra las cinéticas de crecimiento, en presencia de PMNs, de S. aureus control y S. aureus pretratado con imipenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.52 ± 0.15	-0.03 ± 0.19
2	0.75 ± 0.12	-0.13 ± 0.07
3	0.98 ± 0.09	0.22 ± 0.16

Tabla 36. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con imipenem. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

Las diferencias en las cinéticas de crecimiento de bacterias control y bacterias tratadas, en presencia de leucocitos, respecto a sus correspondientes controles en ausencia de PMNs, fueron mayores en el caso de las bacterias tratadas (Tabla 37).

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	-0.11	-0.46
2	-0.10	-0.19
3	-0.06	-0.11

Tabla 37. Diferencias en Log_{10} UFC/ml de bacterias control y tratadas con imipenem, en ausencia y presencia de PMNs.

2.3.2.2.b. Presencia de suero.

Las curvas de crecimiento de S. aureus pretratado con imipenem, en presencia de PMNs y en presencia de PMNs y suero, presentaron grandes diferencias ($p < 0.05$) durante las tres horas del ensayo.

En presencia de suero, el número de bacterias viables, incubadas con PMNs, fue

mayor en el caso de bacterias controles que bacterias tratadas. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a tiempo $t=1$, $t=2$, $t=3$ horas, (figura 5.b.).

La tabla 38 muestra la cinética de crecimiento de S. aureus en presencia de PMNs y suero, de bacterias control y bacterias tratadas con imipenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>	<u>Tratado+PMN+SHN</u>
1	0.23±0.05	-0.43±0.12
2	0.55±0.06	-0.29±0.11
3	0.74±0.14	-0.02±0.07

Tabla 38. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con imipenem, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica, en presencia de suero, de bacterias controles fue del 30.03%, la muerte fagocítica de bacterias pretratadas con imipenem fue del 67.88% (tabla 39, figura 5.c.).

La tabla 39 muestra el porcentaje de bacterias muertas debido a la actividad de los leucocitos PMNs en presencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	38.30%	65.31%
2	24.26%	74.92%
3	27.63%	45.11%

Tabla 39. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus pretratado con imipenem, en presencia de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.2.3. Actividad de los leucocitos PMNs frente a S. aureus pretratado con meropenem.

2.3.2.3.a. Ausencia de suero.

El número de bacterias viables tratadas con meropenem, fue mayor cuando fueron incubadas con PMNs, que en ausencia de estos. (Figura 6.a.).

Se hallaron diferencias significativas entre las bacterias control y tratadas, en presencia de PMNs. La tabla 40 muestra el crecimiento de S.aureus control y tratado, en presencia de PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.52±0.15	-0.08±0.07
2	0.75±0.12	0.10±0.10
3	0.98±0.09	0.41±0.11

Tabla 40. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con meropenem. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La tabla 41 muestra las diferencias en Log₁₀ UFC/ml de bacterias control y tratadas con meropenem, en presencia de leucocitos y ausencia de suero, a lo largo del tiempo.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	-0.11	-0.50
2	-0.10	-0.39
3	-0.06	-0.23

Tabla 41. Diferencias en Log₁₀ UFC/ml de bacterias control y tratadas con meropenem, en ausencia y presencia de PMNs.

2.3.2.3.b. Presencia de suero.

Como en el caso de imipenem las cinéticas de crecimiento de S. aureus pretratado con meropenem en presencia de PMNs, y en presencia de PMNs y suero, presentaron grandes diferencias durante las tres horas del ensayo. El número de bacterias viables fue mayor en el caso de bacterias controles que en el caso de bacterias tratadas (figura 6.b.).

La tabla 42 refleja la cinética de crecimiento de S. aureus en presencia de PMNs y suero, de bacterias control y tratadas con meropenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>	<u>Tratado+PMN+SHN</u>
1	0.23±0.05	-0.33±0.07
2	0.55±0.06	-0.27±0.09
3	0.74±0.14	0.06±0.10

Tabla 42. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con meropenem, en presencia de suero. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica en presencia de suero, de bacterias tratadas fue del 64.20% frente al 30.03% de bacterias controles. (Tabla 43, figura 6.c.). En la tabla 43 se presentan los porcentajes de muerte fagocítica de bacterias control y tratadas, incubadas con suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	38.30%	67.64%
2	24.26%	67.63%
3	27.63%	57.34%

Tabla 43. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus pretratado con meropenem, en presencia de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias

incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.2.4. Actividad de los leucocitos PMNs frente a S. aureus pretratado con cefepime.

2.3.2.4.a. Ausencia de suero.

Como en el caso de los carbapenemes, el número de bacterias viables tratadas con cefepime, fue mayor cuando fueron incubadas con PMNs, que en ausencia de estos (figura 7.a.). Las diferencias entre las cinéticas de crecimiento de bacterias controles y tratadas, en presencia de PMNs, presentaron diferencias estadísticamente significativas, solo a tiempo $t=1$ hora. La tabla 44 muestra el crecimiento de bacterias control y tratadas, en presencia de PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.52±0.15	0.32±0.14
2	0.75±0.12	0.65±0.17
3	0.98±0.09	0.88±0.15

Tabla 44. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con cefepime. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación. La tabla 45 muestra las diferencias (Log_{10} UFC/ml) de bacterias control y tratadas con cefepime, en presencia de leucocitos y ausencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	-0.11	-0.56
2	-0.10	-0.41
3	-0.06	-0.51

Tabla 45. Diferencias en Log_{10} UFC/ml de bacterias control y tratadas con cefepime, en ausencia y presencia de PMNs.

2.3.2.4.b. Presencia de suero.

El suero incrementó la actividad fagocítica de los leucocitos, se hallaron diferencias significativas a tiempo $t=1$ y $t=2$ horas entre las cinéticas de crecimiento de bacterias tratadas, en presencia de PMN y en presencia de PMN y suero. Entre las curvas de crecimiento de bacterias control y tratadas, incubadas con suero y PMNs no se hallaron diferencias significativas durante todo el ensayo. (Figura 7.b.). La tabla 46 muestra el crecimiento de S. aureus, en presencia de PMNs y suero, de bacterias control y tratadas con cefepime.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>	<u>Tratado+PMN+SHN</u>
1	0.23±0.05	-0.15±0.08
2	0.55±0.06	0.44±0.19
3	0.74±0.14	0.75±0.14

Tabla 46. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con cefepime, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica en presencia de suero, de bacterias tratadas fue muy similar al de bacterias control, 37.43% frente al 30.03% respectivamente, es decir no fue observado un incremento en la actividad bactericida de los PMNs debido al pretratamiento antimicrobiano (tabla 47, figura 7.c.). Tabla 47.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	38.30%	48.72%
2	24.26%	41.22%
3	27.63%	22.41%

Tabla 47. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus pretratado con cefepime, en presencia de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias

incubadas en ausencia de PMNs.

2.3.2.5. Actividad de los leucocitos PMNs frente a S. aureus pretratado con cefpodoxima.

2.3.2.5.a. Ausencia de suero.

El número de bacterias tratadas incubadas con PMNs, fue igual que en los casos anteriores, mayor que el número de bacterias tratadas, incubadas en ausencia de leucocitos (figura 8.a.).

Entre las bacterias control y tratadas incubadas con PMNs, fueron halladas diferencias estadísticamente significativas solo durante la primera hora del ensayo. La tabla 48 muestra el crecimiento de bacterias control y tratadas, en presencia de PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN</u>	<u>Tratado+PMN</u>
1	0.52±0.15	0.34±0.17
2	0.75±0.12	0.62±0.07
3	0.98±0.09	0.89±0.16

Tabla 48. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con cefpodoxima. Cambio en el Log₁₀ (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La tabla 49 muestra las diferencias, en Log₁₀ UFC/ml, de bacterias control y bacterias tratadas, con cefpodoxima, en presencia de leucocitos y ausencia de suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control</u>	<u>Tratado</u>
1	-0.11	-0.57
2	-0.10	-0.59
3	-0.06	-0.61

Tabla 49. Diferencias en Log₁₀ UFC/ml de bacterias control y tratadas con cefpodoxima, en ausencia y presencia de PMNs.

2.3.2.5.b. Presencia de suero.

El suero provocó un descenso en el número de bacterias viables pretratadas con cefpodoxima e incubadas con PMNs. Las diferencias entre las cinéticas de crecimiento de bacterias tratadas con cefpodoxima en presencia de suero, y en presencia de PMNs y suero, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) durante las tres horas del ensayo.

Entre las curvas de crecimiento de bacterias control y tratadas, incubadas con PMNs y suero, fueron halladas diferencias estadísticamente significativas con cefpodoxima, en presencia de PMNs y suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+PMN+SHN</u>	<u>Tratado+PMN+SHN</u>
1	0.23 ± 0.05	-0.04 ± 0.06
2	0.55 ± 0.06	0.07 ± 0.12
3	0.74 ± 0.14	0.68 ± 0.22

Tabla 50. Fagocitosis y muerte intracelular por PMNs, de S. aureus pretratado con cefpodoxima, en presencia de suero. Cambio en el Log_{10} (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El porcentaje medio de muerte fagocítica en presencia de suero, de las bacterias tratadas con cefpodoxima fue mayor que el de las bacterias controles, 60.82% frente a 30.03% respectivamente (tabla 51, figura 8.c.).

En la tabla 51 se muestran los porcentajes de muerte fagocítica de bacterias control y tratadas, incubadas con suero.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>Tratado+SHN</u>
1	38.30%	67.26%
2	24.26%	73.12%
3	27.63%	45.10%

Tabla 51. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus pretratado con cefpodoxima, en

presencia de suero. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

Tiempo (h)	1ª hora			2ª hora			3ª hora		
	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>
Suero 20%	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Control	39.75%	66.12%	38.30%	33.93%	65.33%	24.26%	4.50%	71.81%	27.63%
Imipenem	49.88%	84.87%	65.31%	38.34%	85.88%	74.92%	57.34%	66.11%	45.11%
Meropenem	52.23%	79.60%	67.64%	38.34%	77.01%	67.63%	54.14%	70.60%	57.34%
Cefepime	46.36%	73.70%	48.72%	46.30%	81.38%	41.22%	12.90%	79.11%	22.41%
Cefpodoxima	46.29%	62.84%	64.26%	36.90%	66.88%	73.12%	16.87%	76.58%	45.10%

Tabla 52. Resumen de los porcentajes de muerte fagocítica obtenidos para las combinaciones antimicrobiano/microorganismo a lo largo del tiempo.

Tiempo (h)	1ª hora			2ª hora			3ª hora		
Microorganismos	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>
Suero 20%	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Imipenem	0.13	0.44	0.66	0.20	0.36	0.84	0.44	0.06	0.76
Meropenem	0.17	0.38	0.56	0.11	0.28	0.82	0.29	0.09	0.68
Cefepime	0.14	0.25	0.08	0.07	0.23	0.11	0.07	0.19	-0.01
Cefpodoxima	0.02	0.04	0.27	0.10	0.05	0.48	0.14	0.07	0.06

Tabla 53. Resumen de los valores de PALE ($\text{Log}_{10}\text{UFC/ml control} - \text{Log}_{10}\text{UFC/ml tratado}$) obtenidos para las combinaciones antimicrobiano/microorganismo a lo largo del tiempo.

3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS LEUCOCITOS PMNs EN PRESENCIA CONTINUA DE ANTIMICROBIANOS.

3.1. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a E. coli en presencia continua de antimicrobiano.

3.1.1. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a E. coli en presencia continua de imipenem.

3.1.1.1. Efecto de 1/2 CMI de imipenem.

La presencia de 1/2 CMI de imipenem en un cultivo de E. coli redujo significativamente el número de bacterias viables, durante las tres horas de exposición. En presencia de PMNs, se incrementó el descenso en el número de viables y fueron halladas diferencias estadísticamente significativas entre las cinéticas de letalidad de bacterias incubadas con antibiótico, en ausencia de PMNs y en presencia de PMNs (figura 9.a.). La tabla 54 muestra la cinética de letalidad de E. coli en presencia de 1/2 CMI de imipenem y en presencia/ausencia de PMNs.

T(h)	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09	0.05±0.06	-0.46±0.03
2	1.08±0.13	0.62±0.06	-0.06±0.04	-0.73±0.07
3	1.37±0.08	0.82±0.14	-0.12±0.07	-0.84±0.12

Tabla 54. Efecto de 1/2xCMI de imipenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La muerte fagocítica de E. coli fue sinérgicamente incrementada cuando imipenem (1/2 CMI) estuvo continuamente presente en el cultivo bacteriano, es decir, el cultivo del microorganismo en presencia del antimicrobiano y PMNs mostró un descenso mayor en el número de bacterias viables, que la suma del efecto bactericida de imipenem y de la actividad de los leucocitos por separado (figura 9.b., tabla 57).

3.1.1.2. Efecto de 4 CMI de imipenem.

La presencia de 4 CMI de imipenem provocó un rápido y notable descenso en

el número de viables de E. coli. En presencia de PMNs, el descenso fue mayor y las diferencias fueron estadísticamente significativas durante todo el ensayo (figura 9.a.).

La tabla 55 muestra la cinética de letalidad de E. coli incubado con 4 CMI de imipenem, tanto en presencia como en ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>	<u>4CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09	0.08±0.07	-0.71±0.09
2	1.08±0.13	0.62±0.06	-1.60±0.12	-2.49±0.12
3	1.37±0.08	0.82±0.14	-2.11±0.10	-2.88±0.13

Tabla 55. Efecto de 4xCMI de imipenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La exposición continua a imipenem (4 CMI) provocó un incremento sinérgico de la muerte fagocítica de E. coli mayor que en el caso de la exposición a 1/2 CMI (figura 9.b., tabla 57).

La tabla 56 expresa el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI y 4 CMI de imipenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>
1	66.12%	69.01%	83.78%
2	65.33%	78.56%	87.11%
3	71.81%	80.71%	83.02%

Tabla 56. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli en presencia de 1/2xCMI y 4xCMI de imipenem. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

La tabla 57 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.38±0.09	0.72±0.10	0.69±0.09	1.23±0.07	1.48±0.07
2	0.46±0.07	1.14±0.10	2.68±0.12	1.81±0.12	3.57±0.08
3	0.55±0.08	1.49±0.07	3.48±0.1	2.21±0.13	4.25±0.07

Tabla 57. Reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.1.2. Actividad bactericida de PMNs frente a E. coli en presencia continua de meropenem.

3.1.2.1. Efecto de 1/2 CMI de meropenem.

La presencia de 1/2 CMI de meropenem impidió el aumento en el número de viables, si bien no provocó un descenso como en el caso de imipenem. En presencia de PMNs se produjo un descenso en el número de viables y las cinéticas de letalidad de E. coli incubada con 1/2 CMI de meropenem y 1/2 CMI en presencia de PMNs presentaron diferencias estadísticamente significativas durante las tres horas del ensayo (figura 10.a.). La tabla 58 muestra la cinética de letalidad de E. coli en presencia de 1/2 CMI de meropenem y en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09	0.16±0.09	-0.34±0.08
2	1.08±0.13	0.62±0.06	0.19±0.10	-0.54±0.08
3	1.37±0.08	0.82±0.14	0.20±0.12	-0.56±0.13

Tabla 58. Efecto de 1/2x CMI de meropenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La muerte fagocítica de E. coli fue sinérgicamente incrementada, igual que en el caso de imipenem, cuando meropenem (1/2 CMI) estuvo presente en el cultivo bacteriano (figura 10.b., tabla 61).

3.1.2.2. Efecto de 4 CMI de meropenem.

Meropenem (4 CMI) provocó un descenso rápido en el número de bacterias viables, si bien el descenso fue de menor cuantía que en el caso de imipenem. En presencia de PMNs el descenso fue mayor y las diferencias entre las cinéticas de letalidad de *E. coli* incubado con 4 CMI de meropenem, en presencia y ausencia de PMNs, mostraron durante todo el ensayo diferencias estadísticamente significativas (figura 10.a.). La tabla 59 refleja la cinética de letalidad de *E. coli* incubado con 4 CMI de meropenem, tanto en presencia como en ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>	<u>4CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77 ± 0.06	0.39 ± 0.09	0.03 ± 0.12	-0.76 ± 0.10
2	1.08 ± 0.13	0.62 ± 0.06	-0.98 ± 0.13	-1.93 ± 0.11
3	1.37 ± 0.08	0.82 ± 0.14	-1.63 ± 0.06	-2.89 ± 0.10

Tabla 59. Efecto de 4xCMI de meropenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El efecto sinérgico de meropenem (4 CMI) con los leucocitos fue también, como en el caso de imipenem, mayor que el hallado con 1/2 CMI (figura 10.b., tabla 61).

La tabla 60 expresa el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI y 4 CMI de meropenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>
1	66.12%	68.38%	83.78%
2	65.33%	81.37%	88.73%
3	71.81%	82.62%	94.50%

Tabla 60. Porcentaje de muerte fagocítica de *E. coli* en presencia de 1/2xCMI y 4xCMI de meropenem. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias

incubadas en ausencia de PMNs.

La tabla 61 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.38±0.09	0.61±0.12	0.74±0.06	1.11±0.10	1.53±0.10
2	0.46±0.07	0.89±0.10	2.06±0.07	1.62±0.15	3.01±0.11
3	0.55±0.08	1.17±0.09	3.00±0.10	1.93±0.12	4.26±0.15

Tabla 61. Reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.1.3. Actividad bactericida de PMNs frente a E. coli en presencia continua de cefepime.

3.1.3.1. Efecto de 1/2 CMI de cefepime.

Una concentración de 1/2 CMI de cefepime consiguió un descenso en el número de bacterias viables durante todo el ensayo, aunque de menor magnitud que la misma concentración de imipenem. Las diferencias en las cinéticas de letalidad de E. coli en presencia de 1/2 CMI, incubado con y sin PMNs fueron significativas en las tres horas del experimento (figura 11.a.). La tabla 62 muestra la cinética de letalidad de E. coli en presencia de 1/2 CMI de cefepime y en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09	0.04±0.08	-0.30±0.07
2	1.08±0.13	0.62±0.06	-0.19±0.12	-0.51±0.12
3	1.37±0.08	0.82±0.14	-0.30±0.13	-0.62±0.11

Tabla 62. Efecto de 1/2x CMI de cefepime en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El antibiótico en combinación con los leucocitos, ejercen un efecto aditivo en

la muerte fagocítica de E. coli (figura 11.b., tabla 65).

3.1.3.2. Efecto de 4 CMI de cefepime.

La presencia de 4 CMI de cefepime en el medio de incubación de E. coli provocó un descenso mayor en el número de bacterias viables que en presencia de 1/2 CMI. Es decir, como en los casos anteriores de imipenem y meropenem, la actividad bactericida fue dependiente de la concentración de antibiótico.

En presencia de PMNs, el descenso de viables fue mayor que en ausencia de estos (figura 11.a.).

La tabla 63 refleja la cinética de letalidad de E. coli incubado con 4 CMI de cefepime, tanto en ausencia como en presencia de PMNs.

T(h)	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>	<u>4CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77 ± 0.06	0.39 ± 0.09	-0.23 ± 0.11	-0.62 ± 0.12
2	1.08 ± 0.13	0.62 ± 0.06	-0.82 ± 0.12	-1.24 ± 0.15
3	1.37 ± 0.08	0.82 ± 0.14	-1.38 ± 0.12	-2.39 ± 0.10

Tabla 63. Efecto de 4xCMI de cefepime en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

El antibiótico, en combinación con los leucocitos ejerció un efecto aditivo sobre la muerte fagocítica de E. coli. La suma de la actividad de los PMNs y la actividad del antibiótico de forma independiente fue de igual magnitud que el efecto conjunto de PMNs y antimicrobiano (figura 11.b., tabla 65).

La tabla 64 muestra el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI y 4 CMI de cefepime.

La tabla 65 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>
1	66.12%	38.35%	59.27%
2	65.33%	42.44%	61.98%
3	71.81%	52.14%	90.23%

Tabla 64. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli en presencia de 1/2xCMI y 4xCMI de cefepime. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.38±0.09	0.73±0.10	1.00±0.12	0.94±0.12	1.39±0.10
2	0.46±0.07	0.89±0.10	1.90±0.10	1.51±0.13	2.32±0.15
3	0.55±0.08	1.67±0.09	2.75±0.13	1.99±0.17	3.76±0.12

Tabla 65. Reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.1.4. Actividad bactericida de PMNs frente a E. coli en presencia continua de cefpodoxima.

3.1.4.1. Efecto de 1/2 CMI de cefpodoxima.

La exposición de E. coli a 1/2 CMI de cefpodoxima provocó un descenso en el número de bacterias viables a partir de la segunda hora del ensayo. En presencia de PMNs el descenso fue mayor y ocurrió durante las tres horas del ensayo (figura 12.a.).

La tabla 66 muestra la cinética de letalidad de E. coli en presencia de 1/2 CMI de cefpodoxima y en presencia/ausencia de PMNs.

Se halló un efecto aditivo en la combinación de leucocitos y antimicrobianos, es decir, la muerte fagocítica de E. coli en presencia de antibiótico, fue de la misma magnitud que la suma del efecto bactericida del antibiótico y de la actividad de los leucocitos por separado (figura 2.b., tabla 69).

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09	0.26±0.10	-0.13±0.13
2	1.08±0.13	0.62±0.06	0.21±0.11	-0.46±0.14
3	1.37±0.08	0.82±0.14	-0.19±0.13	-0.53±0.07

Tabla 66. Efecto de 1/2xCMI de cefpodoxima en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

3.1.4.2. Efecto de 4 CMI de cefpodoxima.

La incubación de E. coli con 4 CMI de cefpodoxima redujo el número de bacterias viables a partir de la segunda hora de incubación. la presencia de PMNs contribuye a un descenso mayor, las cinéticas de letalidad de E. coli con 4 CMI de cefpodoxima, en presencia y ausencia de PMNs, fueron estadísticamente significativas durante las tres horas del experimento (figura 12.a.).

La tabla 67 muestra la cinética de letalidad de E. coli incubado con 4 CMI de cefpodoxima, tanto en ausencia como en presencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>	<u>4CMI+PMN+SHN</u>
1	0.77±0.06	0.39±0.09	0.12±0.12	-0.27±0.10
2	1.08±0.13	0.62±0.06	-0.89±0.10	-1.42±0.12
3	1.37±0.08	0.82±0.14	-1.35±0.15	-2.01±0.13

Tabla 67. Efecto de 4xCMI de cefpodoxima en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

Se halló un efecto aditivo en la muerte fagocítica de E. coli en presencia continua de 4 CMI de cefpodoxima. la suma de la actividad leucocitaria y la actividad bactericida del antibiótico, independientemente fue del mismo valor que el efecto conjunto de ambos factores (figura 12.b., tabla 69).

La tabla 68 muestra el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI y 4 CMI de cefpodoxima.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>4CMI+SHN</u>
1	66.12%	59.26%	59.25%
2	65.33%	67.63%	70.49%
3	71.81%	54.28%	78.12%

Tabla 68. Porcentaje de muerte fagocítica de E. coli en presencia de 1/2x CMI y 4x CMI de cefpodoxima. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

La tabla 69 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.38±0.09	0.51±0.10	0.65±0.11	0.90±0.07	1.04±0.15
2	0.46±0.07	0.87±0.13	1.97±0.12	1.54±0.09	2.50±0.10
3	0.55±0.08	1.56±0.10	2.72±0.11	1.90±0.10	3.38±0.13

Tabla 69. Reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.2. Actividad bactericida de leucocitos PMNs frente a S. aureus en presencia continua de antimicrobiano.

3.2.1. Actividad bactericida de PMNs frente a S. aureus en presencia continua de imipenem.

3.2.1.1. Efecto de 1/2 CMI de imipenem.

La presencia de 1/2 CMI de imipenem en el cultivo de S. aureus estabilizó el crecimiento bacteriano durante las tres horas del ensayo. En presencia de PMNs se

produjo un descenso poco acentuado, aunque las cinéticas de letalidad en presencia y en ausencia de PMNs, con 1/2 CMI de imipenem, presentaron diferencias significativas (figura 13.a.).

La tabla 70 muestra la cinética de letalidad de S. aureus en presencia de 1/2 CMI de imipenem y en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	0.14±0.07	-0.01±0.07
2	0.67±0.06	0.55±0.06	0.13±0.14	-0.13±0.09
3	0.88±0.12	0.74±0.14	0.15±0.08	-0.18±0.10

Tabla 70. Efecto de 1/2xCMI de imipenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La muerte fagocítica de S. aureus presentó un incremento sinérgico debido a la exposición continua a 1/2 CMI de imipenem (figura 13.b., tabla 74). La tabla 71 expresa el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMN, en presencia de 1/2 CMI de imipenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2xCMI+SHN</u>
1	38.35%	29.23%
2	24.15%	45.03%
3	27.55%	53.24%

Tabla 71. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus en presencia de 1/2xCMI de imipenem. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

3.2.1.2. Efecto de 4 CMI de imipenem.

La presencia de 4 CMI de imipenem provocó un descenso en el número de bacterias viables. En presencia de PMNs, el descenso fue menor que en ausencia de estos, las cinéticas de letalidad fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (figura 13.a.).

La tabla 72 muestra la cinética de letalidad de S. aureus incubado con 4 CMI de imipenem, tanto en presencia como en ausencia de PMNs.

T(h)	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>	<u>4xCMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	-0.22±0.07	-0.05±0.10
2	0.67±0.06	0.55±0.06	-2.15±0.05	-1.97±0.12
3	0.88±0.12	0.74±0.14	-2.57±0.09	-2.42±0.07

Tabla 72. Efecto de 4xCMI de imipenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La combinación de imipenem (4 CMI) y la actividad de los leucocitos tuvo como resultado un efecto menor que la suma de ambos efectos independientemente (figura 13.b., tabla 74).

En presencia de 4 CMI de los antibióticos de este estudio, la incubación de S. aureus con leucocitos PMNs, dio como resultado un número mayor de UFC respecto al correspondiente control, es decir, la presencia de 4 CMI en ausencia de PMNs.

Este hecho que se analizará en el capítulo Discusión, no permite presentar los resultados de muerte fagocítica en términos de porcentaje, por ello, los resultados referentes al número de UFC obtenidos en presencia de 4 CMI de antibiótico se presentan en incremento de Log_{10} UFC/ml a lo largo del tiempo.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>
1	-0.21	0.17
2	-0.12	0.18
3	-0.14	0.15

Tabla 73. Diferencias en Log_{10} UFC/ml de bacterias control e incubadas con imipenem, en ausencia y presencia de PMNs.

La tabla 74 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.21±0.07	0.30±0.13	0.66±0.09	0.45±0.11	0.49±0.05
2	0.12±0.06	0.54±0.10	2.82±0.05	0.80±0.10	2.64±0.17
3	0.14±0.08	0.73±0.07	3.45±0.06	1.06±0.07	3.30±0.03

Tabla 74. Reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.2.2. Actividad bactericida de PMNs frente a S. aureus en presencia continua de meropenem.

3.2.2.1. Efecto de 1/2 CMI de meropenem.

La presencia de 1/2 CMI de meropenem estabiliza el crecimiento de S.aureus. En presencia de PMNs, se produjo un pequeño descenso en el número de viables, las diferencias entre las cinéticas de letalidad de S. aureus con 1/2 CMI de meropenem, en presencia y ausencia de PMNs fueron solo significativas a tiempo t=3 horas (figura 14.a.).

La tabla 75 muestra la cinética de letalidad de S. aureus en presencia de 1/2 CMI de imipenem y en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	0.01±0.12	-0.03±0.08
2	0.67±0.06	0.55±0.06	0.07±0.07	-0.04±0.09
3	0.88±0.12	0.74±0.14	0.16±0.06	-0.13±0.10

Tabla 75. Efecto de 1/2xCMI de meropenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La muerte fagocítica de S. aureus en presencia de 1/2 CMI de meropenem presentó efecto aditivo, es decir, la acción conjunta del antibiótico y los leucocitos fue de igual magnitud que la suma de ambos efectos por separado (figura 14.b., tabla 79). La tabla 76 expresa el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI de meropenem.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2xCMI+SHN</u>
1	38.35%	9.09%
2	24.15%	22.35%
3	27.55%	43.74%

Tabla 76. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus en presencia de 1/2xCMI de meropenem. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

3.2.2.2. Efecto de 4 CMI de meropenem.

La presencia de 4 CMI de meropenem ocasionó un descenso en el número de bacterias viables. En presencia de PMNs, el descenso fue menor que en ausencia de estos. Las cinéticas de letalidad fueron estadísticamente significativas a tiempo t=2 y t=3 horas (figura 14.a.). La tabla 77 muestra la cinética de letalidad de S. aureus incubado con 4 CMI de meropenem, tanto en presencia como en ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>	<u>4xCMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	-0.12±0.10	-0.24±0.09
2	0.67±0.06	0.55±0.06	-2.04±0.12	-0.74±0.13
3	0.88±0.12	0.74±0.14	-2.74±0.13	-1.34±0.13

Tabla 77. Efecto de 4xCMI de meropenem en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

Como en el caso de imipenem, la combinación de meropenem (4 CMI) y la actividad de los leucocitos, tuvo como resultado un efecto menor que la suma de ambos efectos independientemente (figura 14.b., tabla 79).

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>
1	-0.21	0.12
2	-0.12	1.30
3	-0.14	1.40

Tabla 78. Diferencias en Log₁₀ UFC/ml de bacterias control e incubadas con meropenem, en ausencia y presencia de PMNs.

La tabla 79 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.21±0.07	0.43±0.06	0.56±0.17	0.47±0.10	0.68±0.09
2	0.12±0.06	0.60±0.08	2.71±0.11	0.71±0.15	1.41±0.14
3	0.14±0.08	0.72±0.07	3.62±0.09	1.01±0.11	2.22±0.13

Tabla 79. Reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.2.3. Actividad bactericida de PMNs frente a S. aureus en presencia continua de cefepime.

3.2.3.1. Efecto de 1/2 CMI de cefepime.

La presencia de 1/2 CMI de cefepime dio lugar a diferencias significativas con la cinética de crecimiento de bacterias control aunque no provocó un descenso en el número de viables (figura 15.a.). La tabla 80 refleja la cinética de letalidad de S.aureus en presencia de 1/2 CMI de cefepime y en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	-0.04±0.10	-0.17±0.07
2	0.67±0.06	0.55±0.06	0.14±0.11	-0.42±0.09
3	0.88±0.12	0.74±0.14	0.26±0.12	-0.89±0.10

Tabla 80. Efecto de 1/2x CMI de cefepime en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

Se encontró un efecto sinérgico en la muerte fagocítica de S. aureus en presencia continua de 1/2 CMI de cefepime (figura 15.b., tabla 84). La tabla 81 expresa el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI de cefepime.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2x CMI+SHN</u>
1	38.35%	25.88%
2	24.15%	89.28%
3	27.55%	92.92%

Tabla 81. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus en presencia de 1/2x CMI de cefepime. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

3.2.3.2. Efecto de 4 CMI de cefepime.

La presencia de 4 CMI de cefepime provocó un descenso en el número de bacterias viables. En presencia de PMNs, el descenso fue menor que en ausencia de estos, las cinéticas de letalidad mostraron diferencias estadísticamente significativas a tiempo $t=2$ y $t=3$ horas (figura 15.a.).

La tabla 82 muestra la cinética de letalidad de S. aureus incubado con 4 CMI de cefepime, en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>	<u>4xCMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	-0.41±0.10	-0.38±0.12
2	0.67±0.06	0.55±0.06	-1.14±0.11	-0.80±0.03
3	0.88±0.12	0.74±0.14	-2.02±0.07	-1.47±0.13

Tabla 82. Efecto de 4xCMI de cefepime en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La combinación de cefepime (4 CMI) y la actividad de los PMNs dio como resultado un efecto menor que la suma de los efectos de forma independiente (figura 15.b., tabla 84).

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>
1	-0.21	0.03
2	-0.12	0.34
3	-0.14	0.55

Tabla 83. Diferencias en Log_{10} UFC/ml de bacterias control e incubadas con cefepime, en ausencia y presencia de PMNs.

La tabla 84 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.21±0.07	0.48±0.07	0.85±0.10	0.61±0.07	0.82±0.03
2	0.12±0.06	0.53±0.06	1.81±0.15	1.09±0.06	1.47±0.06
3	0.14±0.08	0.62±0.09	2.90±0.10	1.77±0.09	2.35±0.09

Tabla 84. Reducción de bacterias viables, expresada en Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

3.2.4. Actividad bactericida de PMNs frente a S. aureus en presencia continua de cefpodoxima.

3.2.4.1. Efecto de 1/2 CMI de cefpodoxima.

La presencia de 1/2 CMI de cefpodoxima no provocó un descenso en el número de viables aunque el número de UFC/ml a lo largo de las tres horas del ensayo fue menor y presentó diferencias estadísticamente significativas con la cinética de crecimiento de bacterias control (figura 16.a.).

La tabla 85 refleja la cinética de letalidad de S. aureus en presencia de 1/2 CMI de cefpodoxima y en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>1/2CMI+SHN</u>	<u>1/2CMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	0.01±0.09	-0.27±0.07
2	0.67±0.06	0.55±0.06	0.23±0.10	-0.44±0.11
3	0.88±0.12	0.74±0.14	0.32±0.12	-0.91±0.13

Tabla 85. Efecto de 1/2x CMI de cefpodoxima en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación. La presencia de 1/2 CMI de cefpodoxima provocó un efecto sinérgico en la muerte fagocítica de S. aureus (figura 16.b., tabla 89).

La tabla 86 expresa el porcentaje de muerte fagocítica por leucocitos PMNs, en presencia de 1/2 CMI de cefpodoxima.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>1/2xCMI+SHN</u>
1	38.35%	47.51%
2	24.15%	78.62%
3	27.55%	94.11%

Tabla 86. Porcentaje de muerte fagocítica de S. aureus en presencia de 1/2xCMI de cefpodoxima. Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

3.2.4.2. Efecto de 4 CMI de cefpodoxima.

La presencia de 4 CMI de cefpodoxima, provocó un descenso en el número de bacterias viables. En presencia de PMNs, tuvo lugar el mismo efecto que con los anteriores antibióticos, el descenso fue menor que en ausencia de estos. Las cinéticas de letalidad fueron diferentes de forma significativa durante todo el experimento (figura 16.a.). La tabla 87 muestra la cinética de letalidad de S. aureus incubado con 4 CMI de cefpodoxima, en presencia/ausencia de PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+SHN</u>	<u>C+PMN+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>	<u>4xCMI+PMN+SHN</u>
1	0.44±0.07	0.23±0.05	-0.46±0.10	-0.34±0.13
2	0.67±0.06	0.55±0.06	-1.50±0.11	-0.75±0.11
3	0.88±0.12	0.74±0.14	-2.17±0.07	-1.63±0.17

Tabla 87. Efecto de 4xCMI de cefpodoxima en presencia/ausencia de PMNs. Cambio en el Log₁₀ UFC/ml (±D.E.) del total de bacterias viables después de t horas de incubación.

La combinación de cefpodoxima (4 CMI) y la actividad de los leucocitos dio como resultado un efecto menor que la suma de los efectos de forma independiente (figura 16.b., tabla 89).

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Control+SHN</u>	<u>4xCMI+SHN</u>
1	-0.21	0.80
2	-0.12	0.40
3	-0.14	0.54

Tabla 88. Diferencias en Log_{10} UFC/ml de bacterias control e incubadas con cefpodoxima, en ausencia y presencia de PMNs. La tabla 89 expresa la reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml, respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

<u>T(h)</u>	<u>C+PMN</u>	<u>1/2CMI</u>	<u>4CMI</u>	<u>1/2CMI+PMN</u>	<u>4CMI+PMN</u>
1	0.21±0.07	0.43±0.07	0.90±0.12	0.71±0.17	0.78±0.12
2	0.12±0.06	0.44±0.05	1.82±0.13	1.11±0.13	1.42±0.13
3	0.14±0.08	0.56±0.09	3.00±0.10	1.79±0.10	2.51±0.14

Tabla 89. Reducción de bacterias viables, expresada en Log_{10} UFC/ml (\pm D.E.) respecto al cultivo control, sin antibiótico ni PMNs.

	Fase postantibiótica		Exposición continua			
	<u>E. coli</u>	<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>	
Antimicrobianos	4xCMI	4xCMI	1/2xCMI	4xCMI	1/2xCMI	4xCMI
Imipenem	+	+	s	s	s	↓
Meropenem	+	+	s	s	a	↓
Cefepime	+	-	a	a	s	↓
Cefpodoxima	-	+	a	a	s	↓

Tabla 90. Resumen de los resultados. Actividad leucocitaria en fase postantibiótica y con exposición continua de β -lactámicos.

+ (existencia de efecto PALE); - (ausencia de efecto PALE); s (sinergismo); a (aditividad); ↓ (efecto conjunto menor).

GRÁFICOS

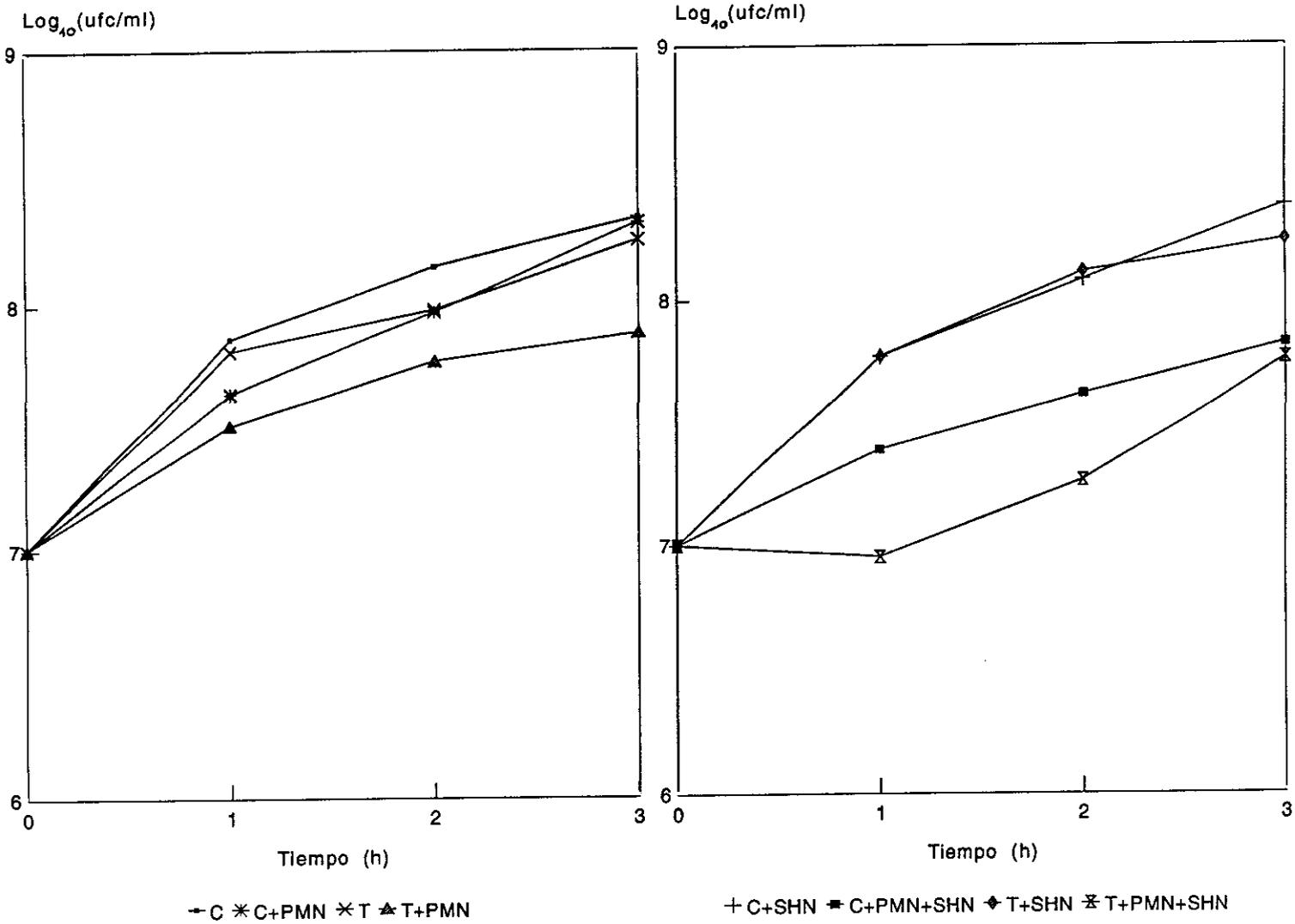
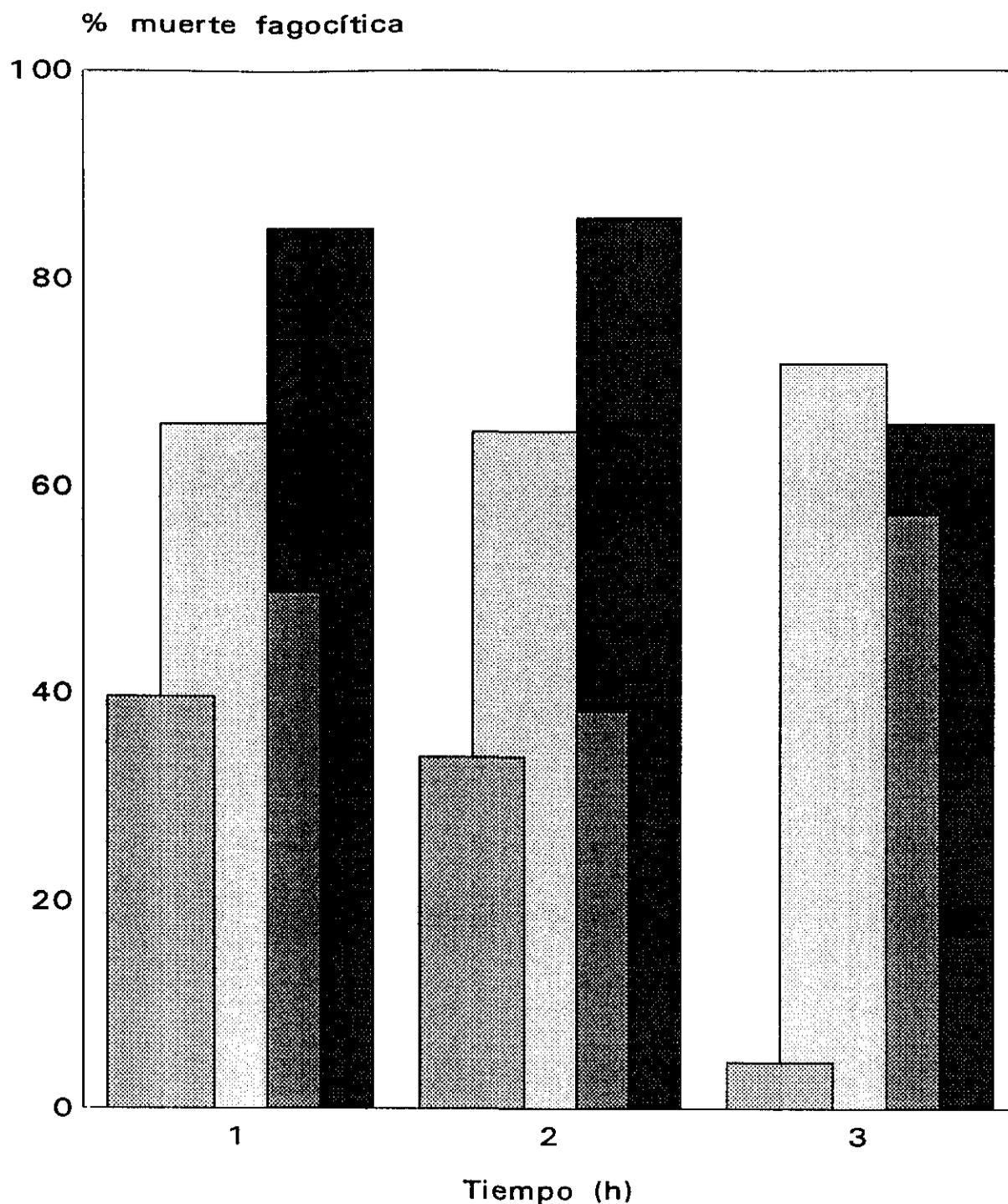


Figura 1.a. Cinéticas de crecimiento de *E. coli*, pretratado con imipenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

Figura 1.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *E. coli*, pretratado con imipenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.



Control
 Control + SHN
 Pretratado
 Pretratado + SHN

Figura 1.c. Muerte fagocítica de *E. coli* pretratado con imipenem y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

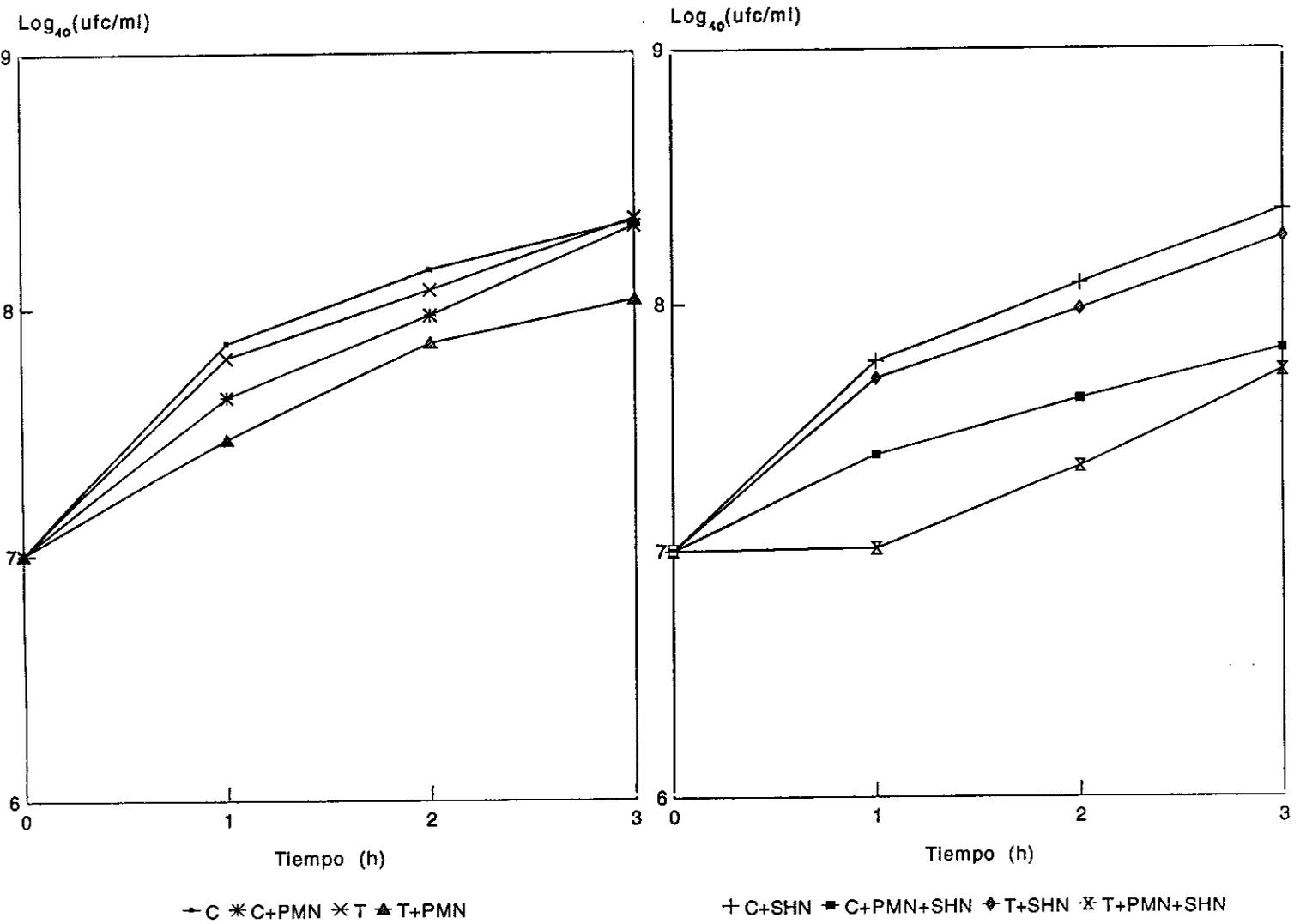
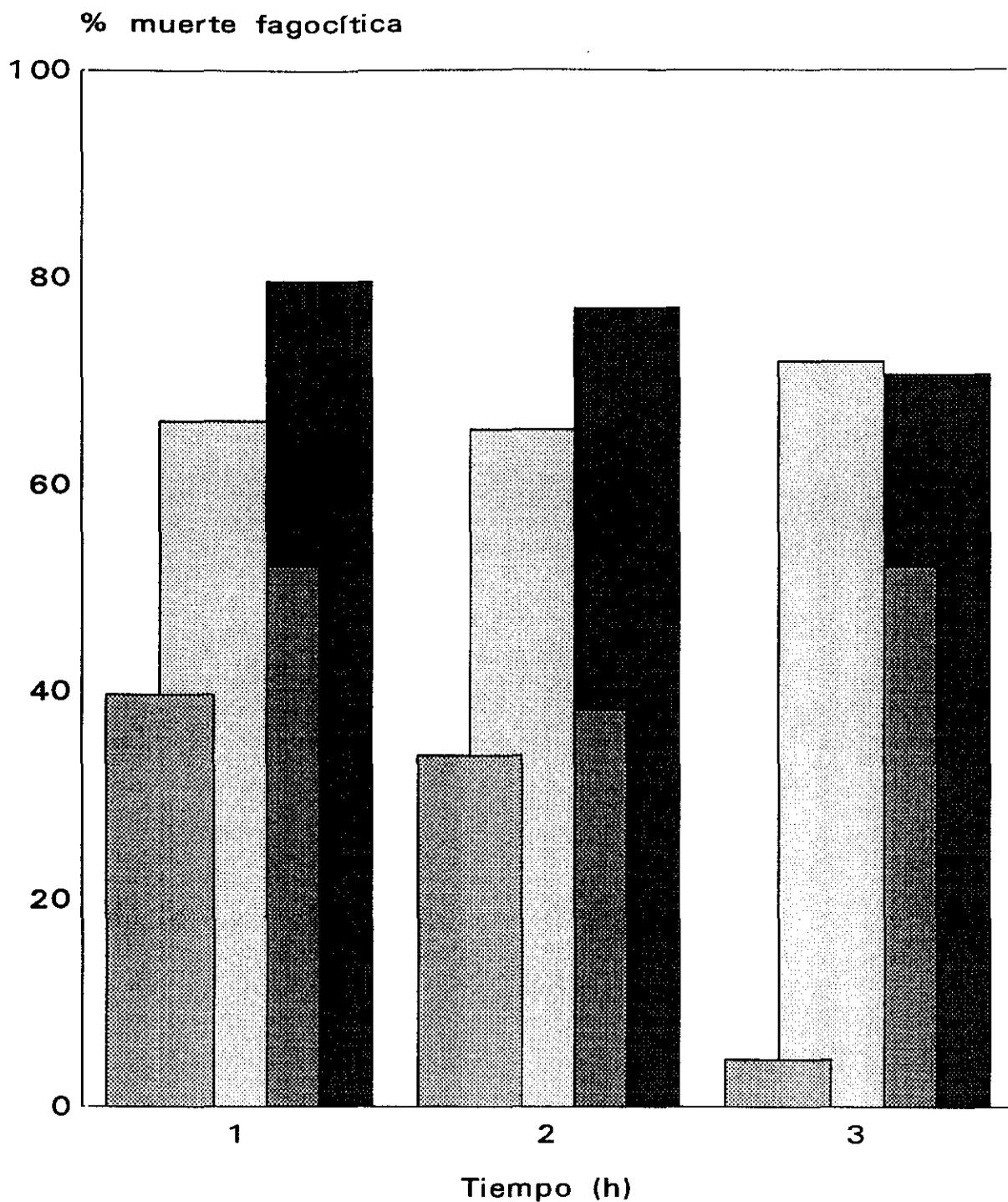


Figura 2.a. Cinéticas de crecimiento de *E. coli*, pretratado con meropenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.
 Figura 2.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *E. coli*, pretratado con meropenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.



Control
 Control + SHN
 Pretratado
 Pretratado + SHN

Figura 2.c. Muerte fagocítica de *E. coli* pretratado con meropenem y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

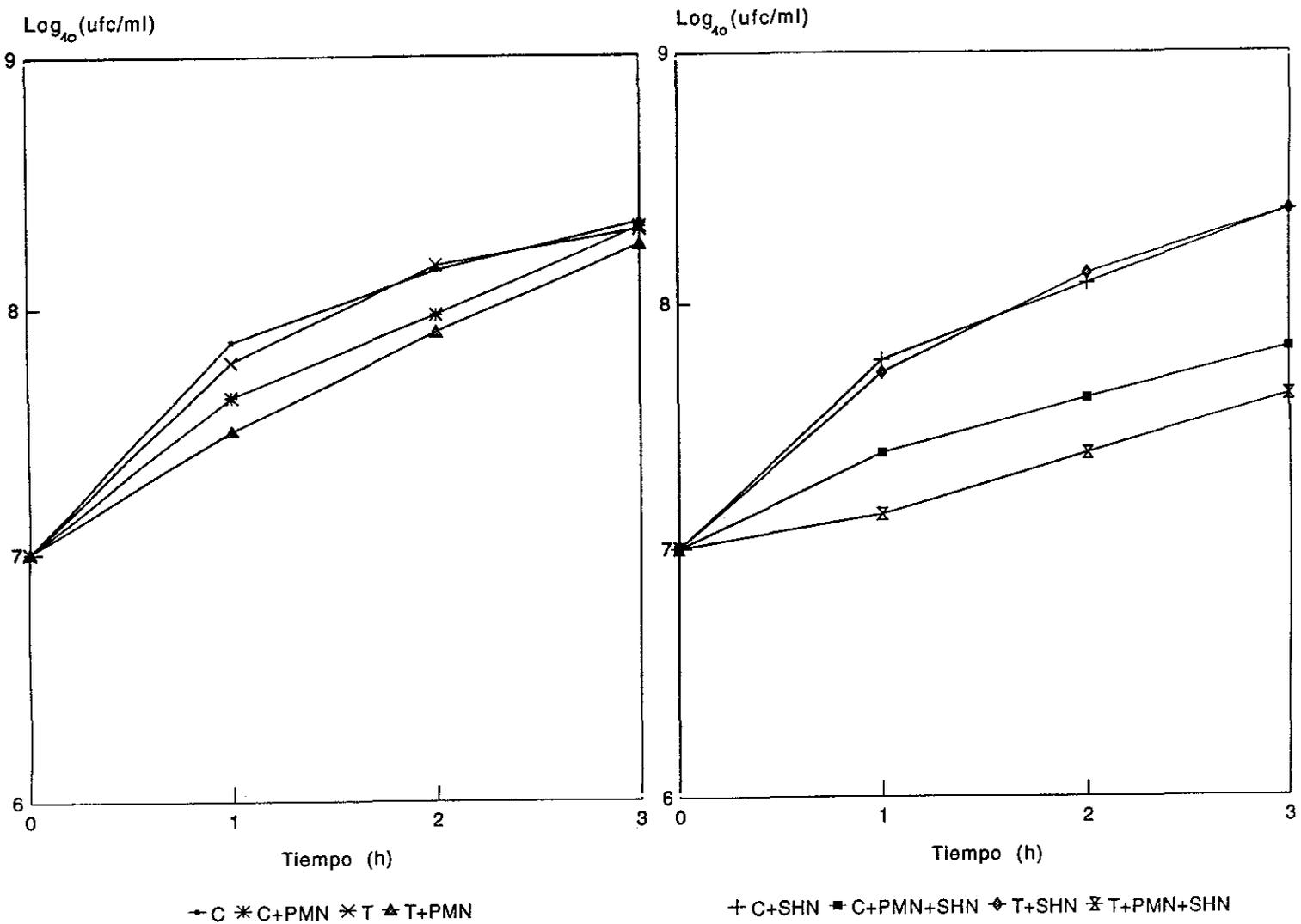


Figura 3.a. Cinéticas de crecimiento de *E. coli*, pretratado con cefepime (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

Figura 3.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *E. coli*, pretratado con cefepime (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

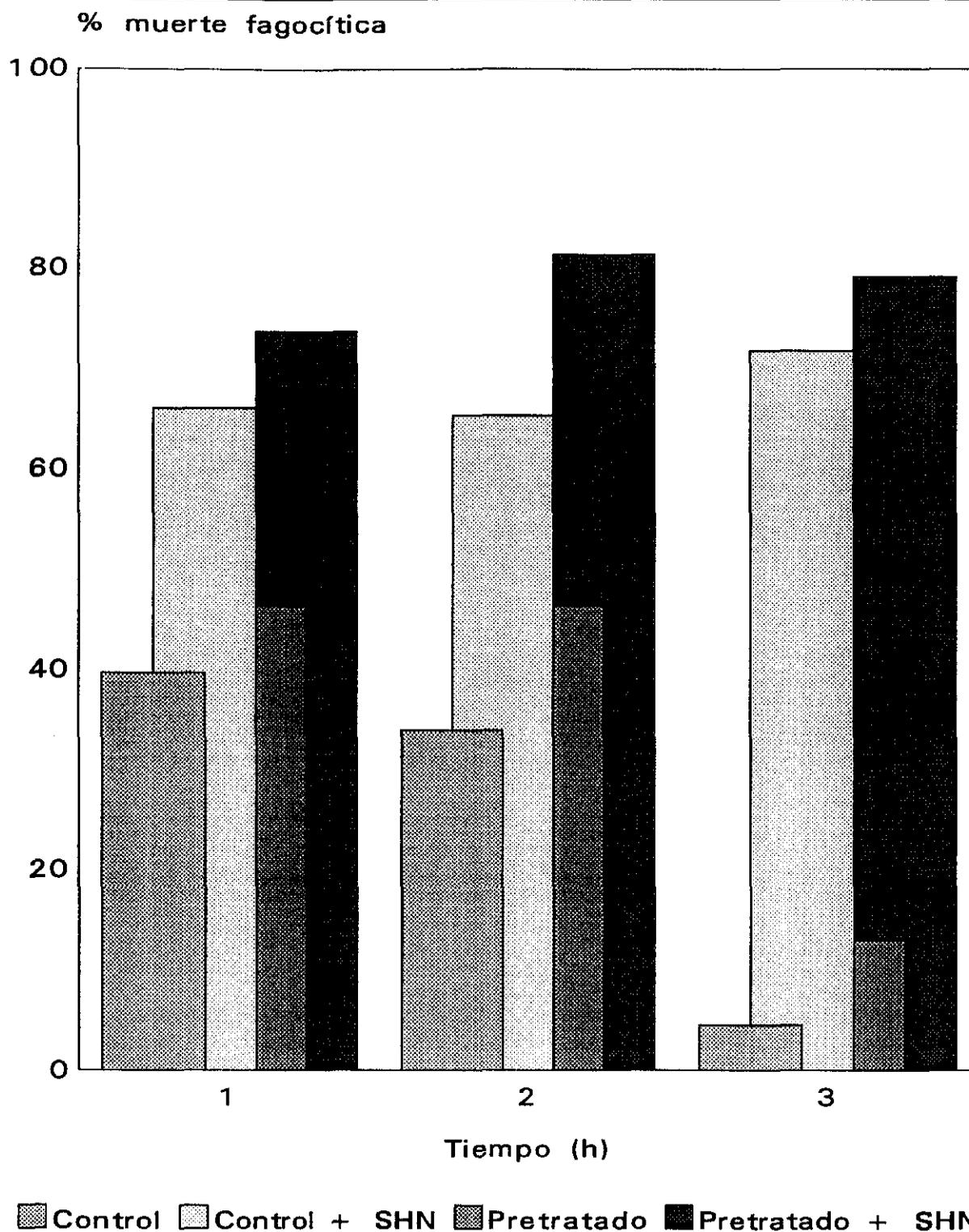


Figura 3.c. Muerte fagocítica de *E. coli* pretratado con cefepime y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

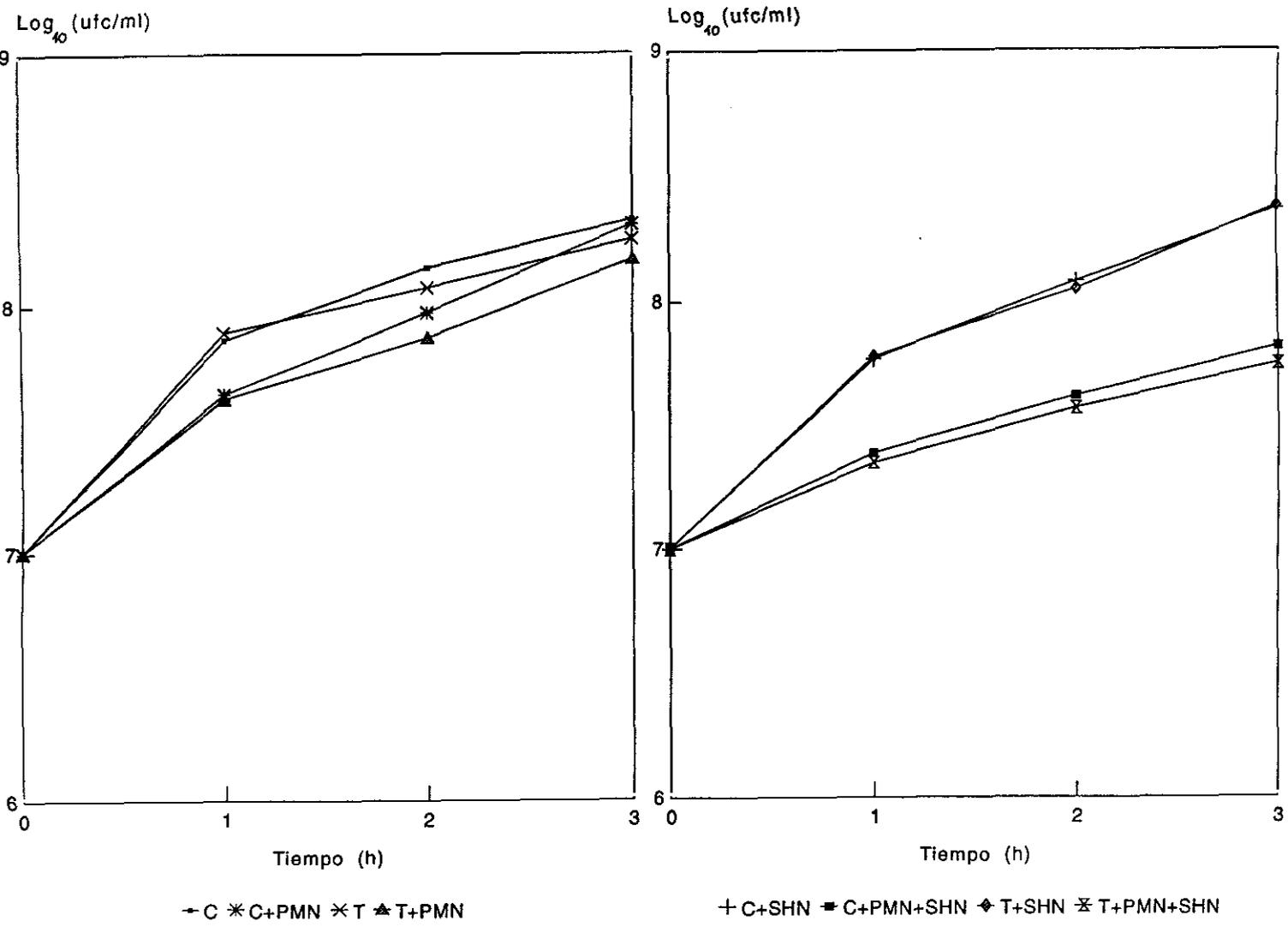


Figura 4.a. Cinéticas de crecimiento de *E. coli*, pretratado con cefpodoxima (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.
 Figura 4.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *E. coli*, pretratado con cefpodoxima (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

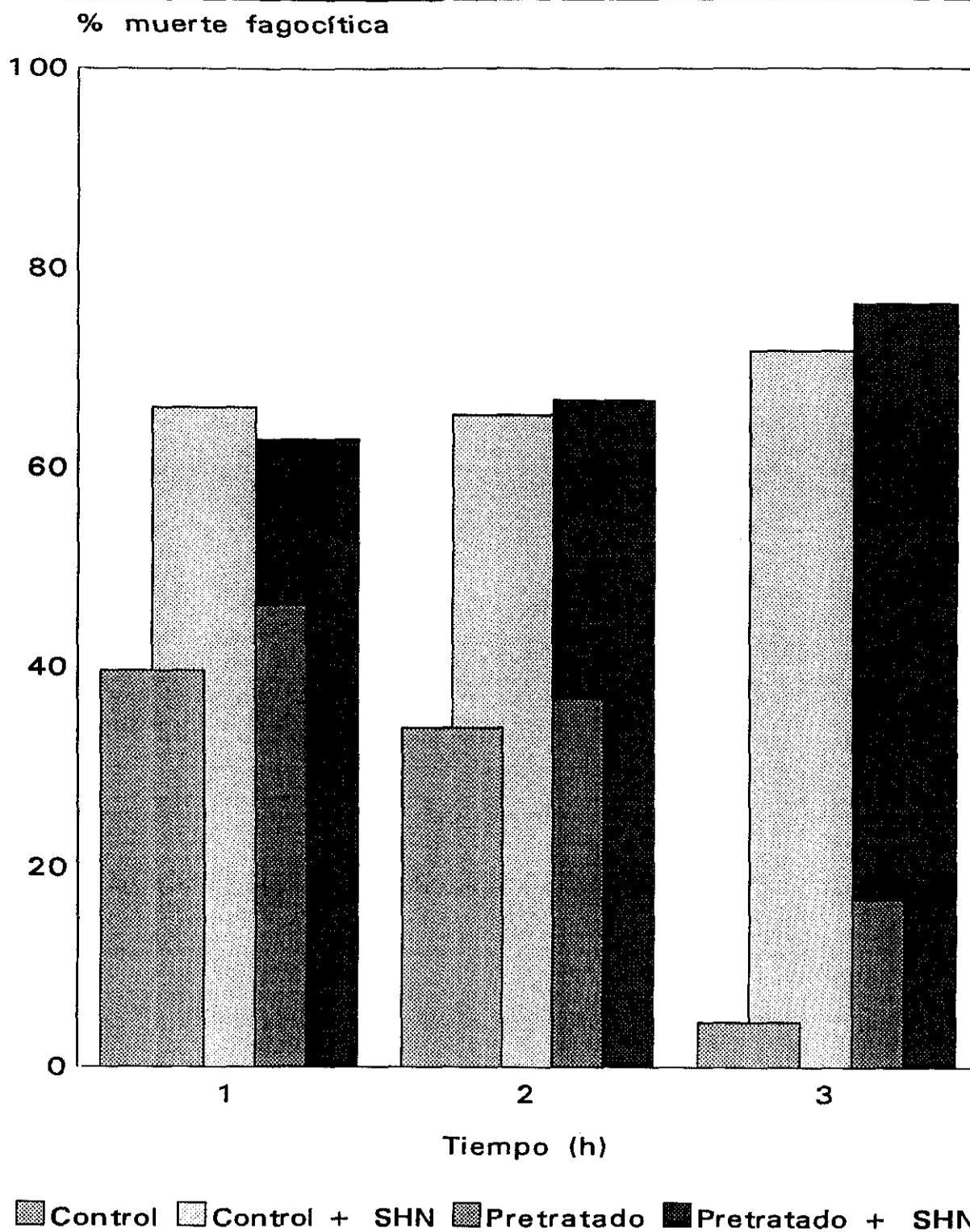


Figura 4.c. Muerte fagocítica de *E. coli* pretratado con cefpodoxima y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

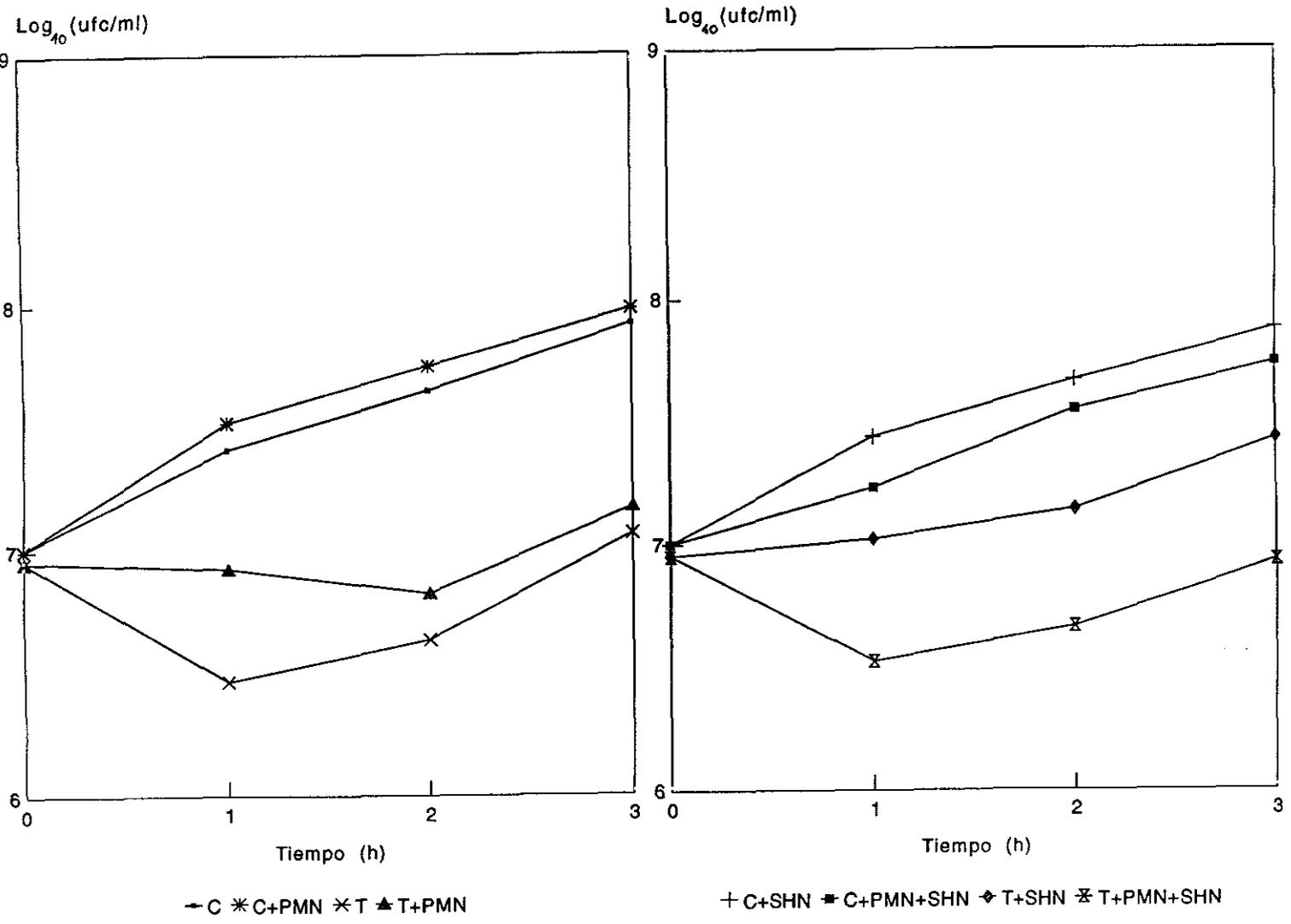


Figura 5.a. Cinéticas de crecimiento de *S. aureus*, pretratado con imipenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.
 Figura 5.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *S. aureus*, pretratado con imipenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

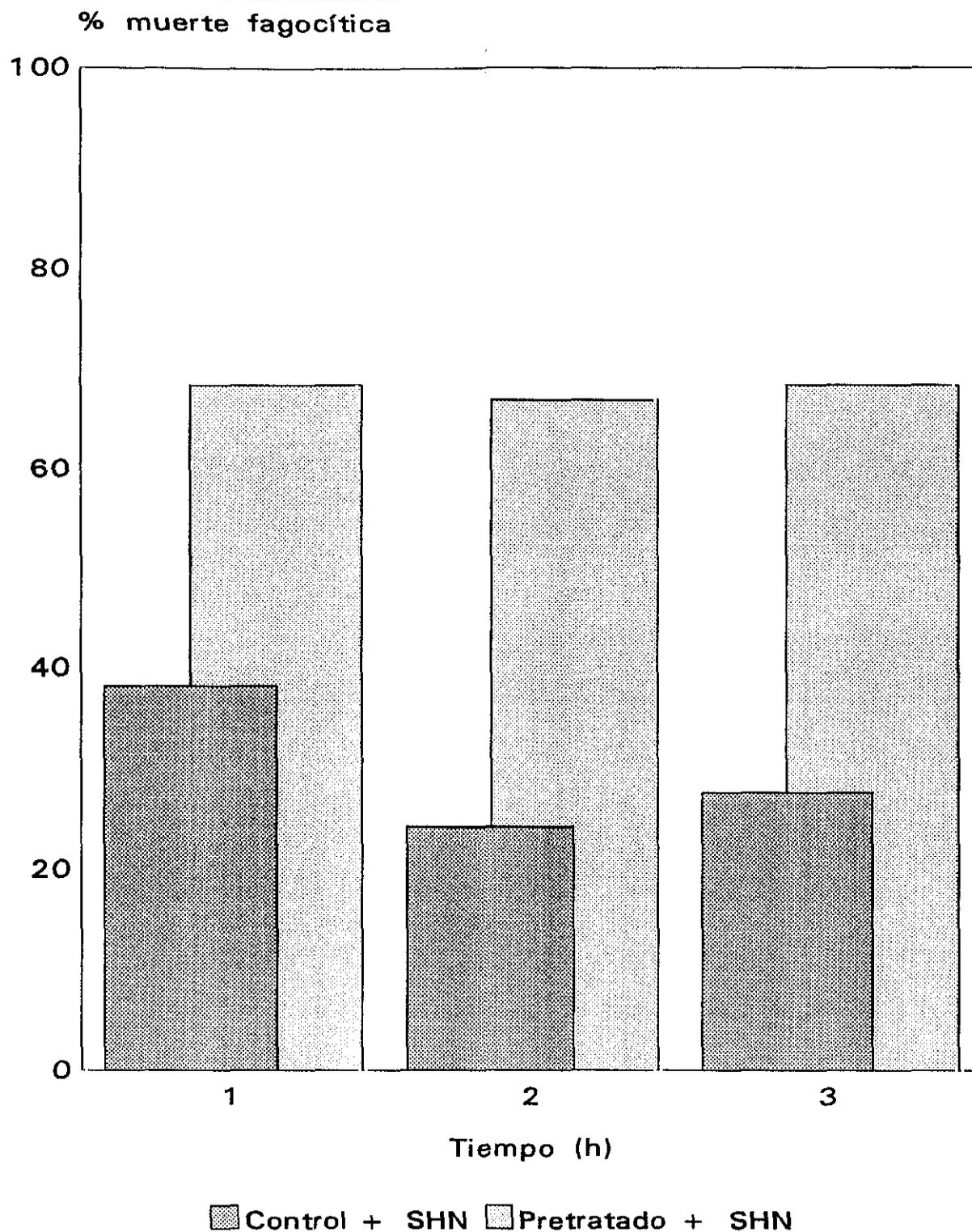


Figura 5.c. Muerte fagocítica de *S. aureus* pretratado con imipenem y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

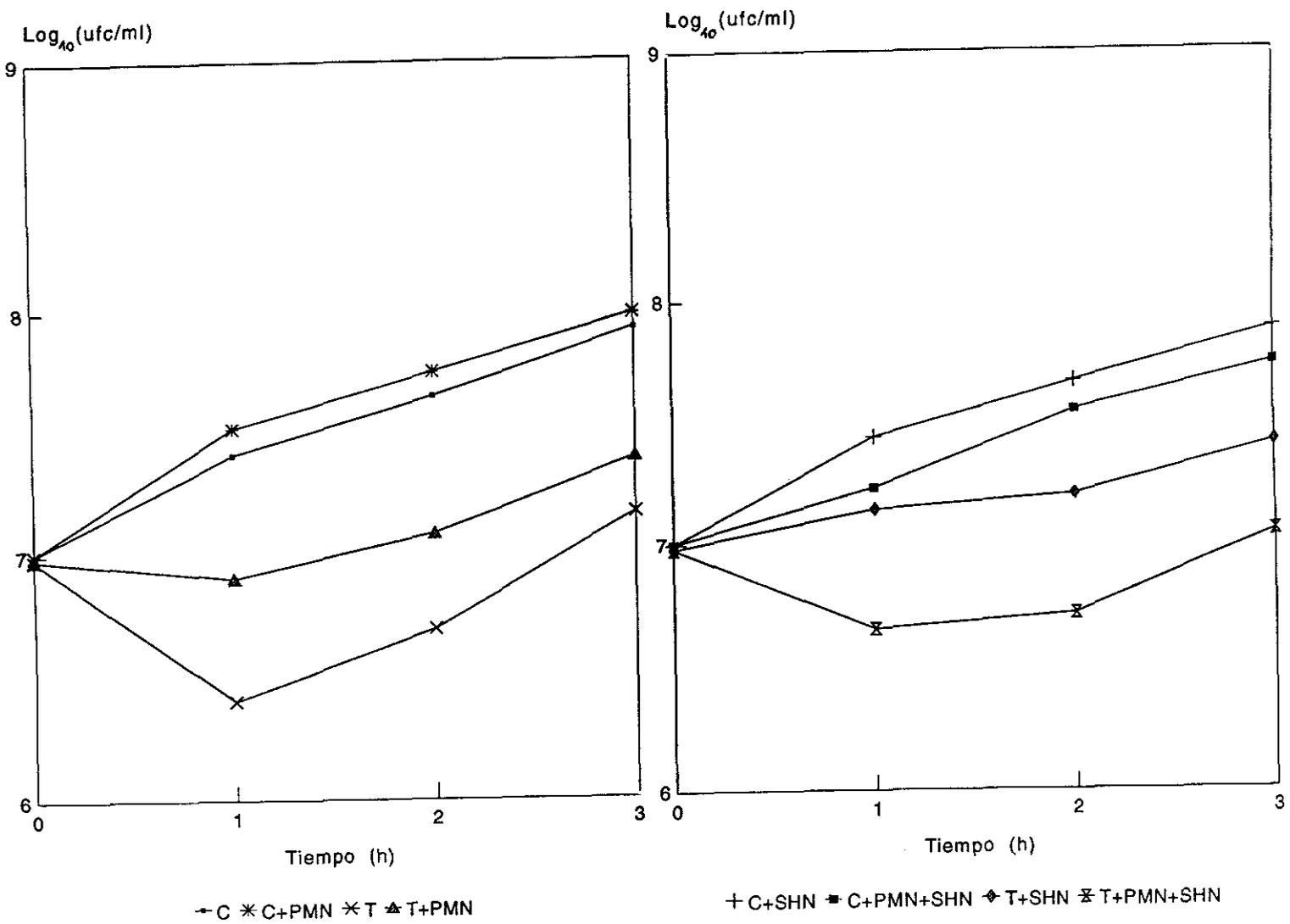


Figura 6.a. Cinéticas de crecimiento de *S. aureus*, pretratado con meropenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.
 Figura 6.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *S. aureus*, pretratado con meropenem (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

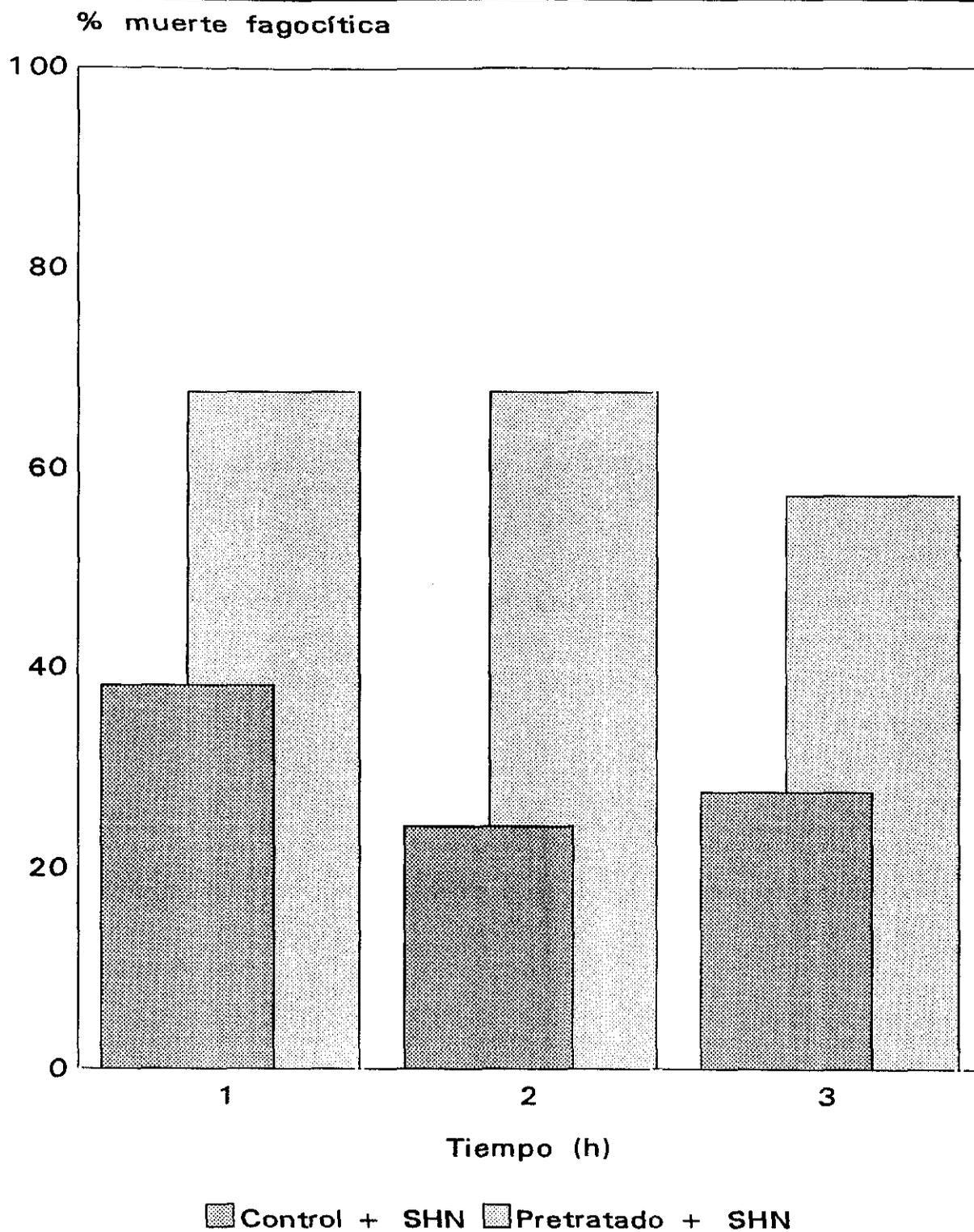


Figura 6.c. Muerte fagocítica de *S. aureus* pretratado con meropenem y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

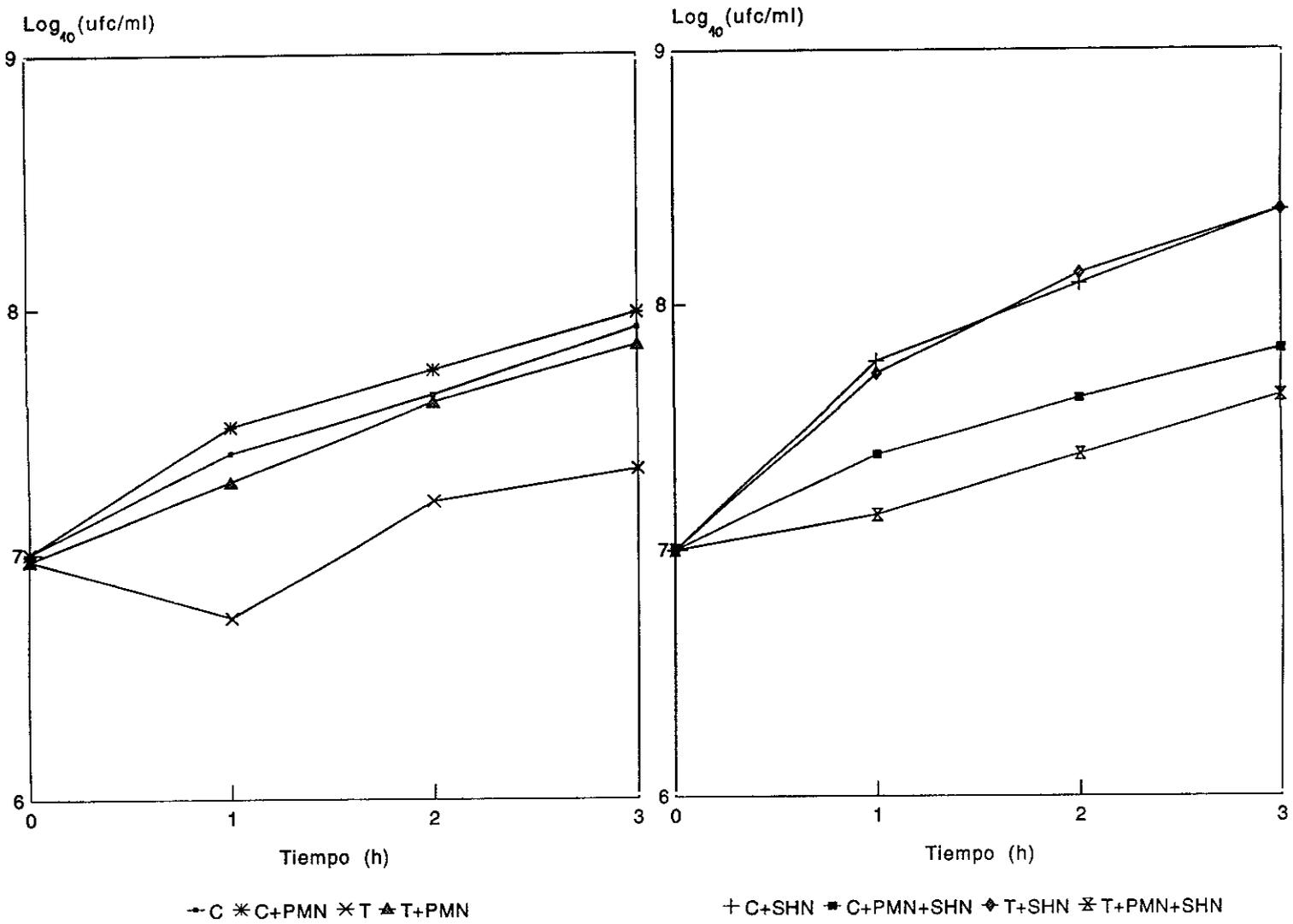


Figura 7.a. Cinéticas de crecimiento de *S. aureus*, pretratado con cefepime (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

Figura 7.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *S. aureus*, pretratado con cefepime (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

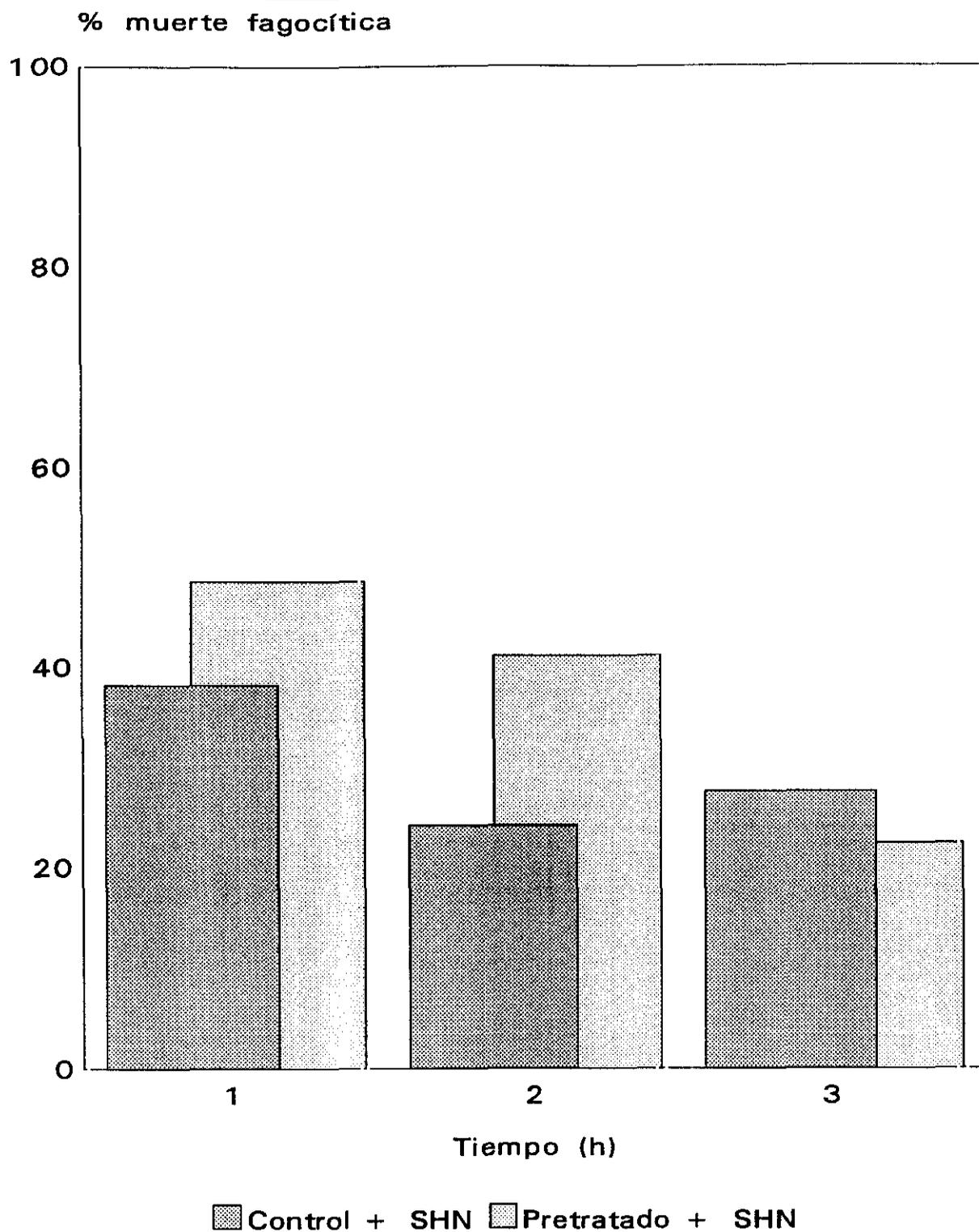


Figura 7.c. Muerte fagocítica de *S. aureus* pretratado con cefepime y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

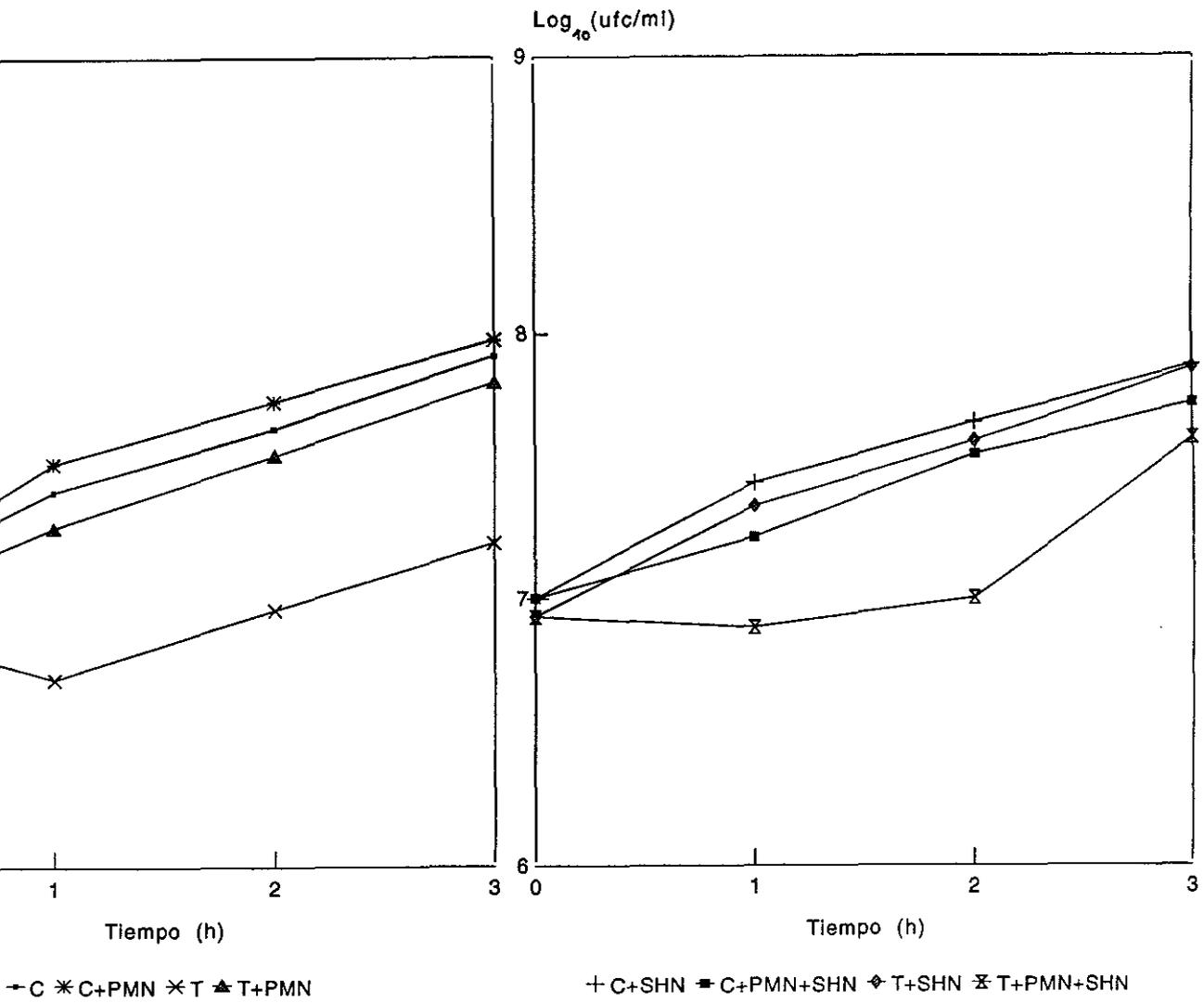


Figura 8.a. Cinéticas de crecimiento de *S. aureus*, pretratado con cefpodoxima (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.
 Figura 8.b. Cinéticas de crecimiento con suero (SHN) de *S. aureus*, pretratado con cefpodoxima (T) y sin pretratamiento (C), en presencia y ausencia de PMNs.

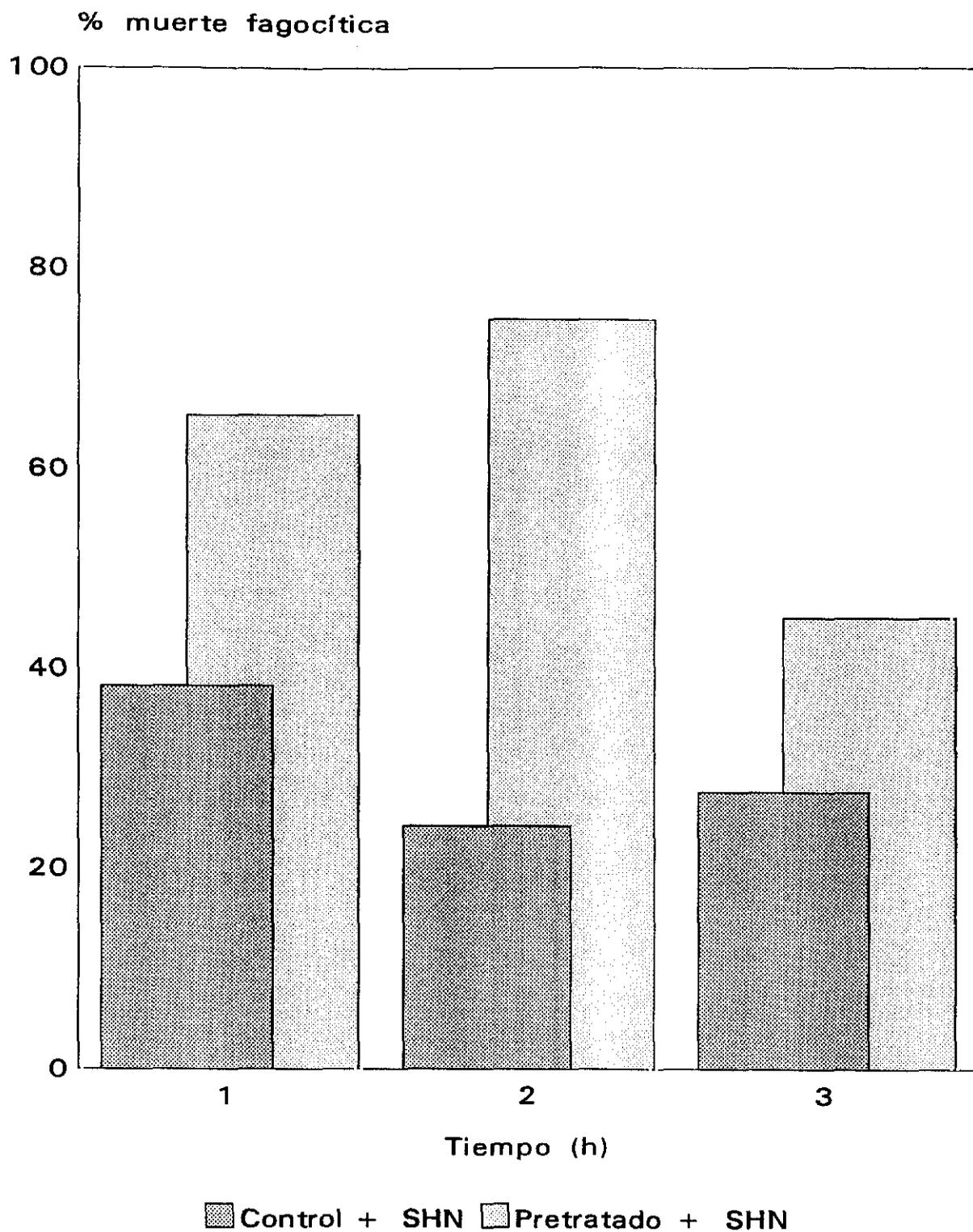


Figura 8.c. Muerte fagocítica de *S. aureus* pretratado con cefpodoxima y sin pretratamiento (control), en presencia y ausencia de suero (SHN).

* Los valores, expresados en porcentaje, se refieren al descenso en el número de bacterias incubadas con PMNs, con respecto al número de bacterias incubadas en ausencia de PMNs.

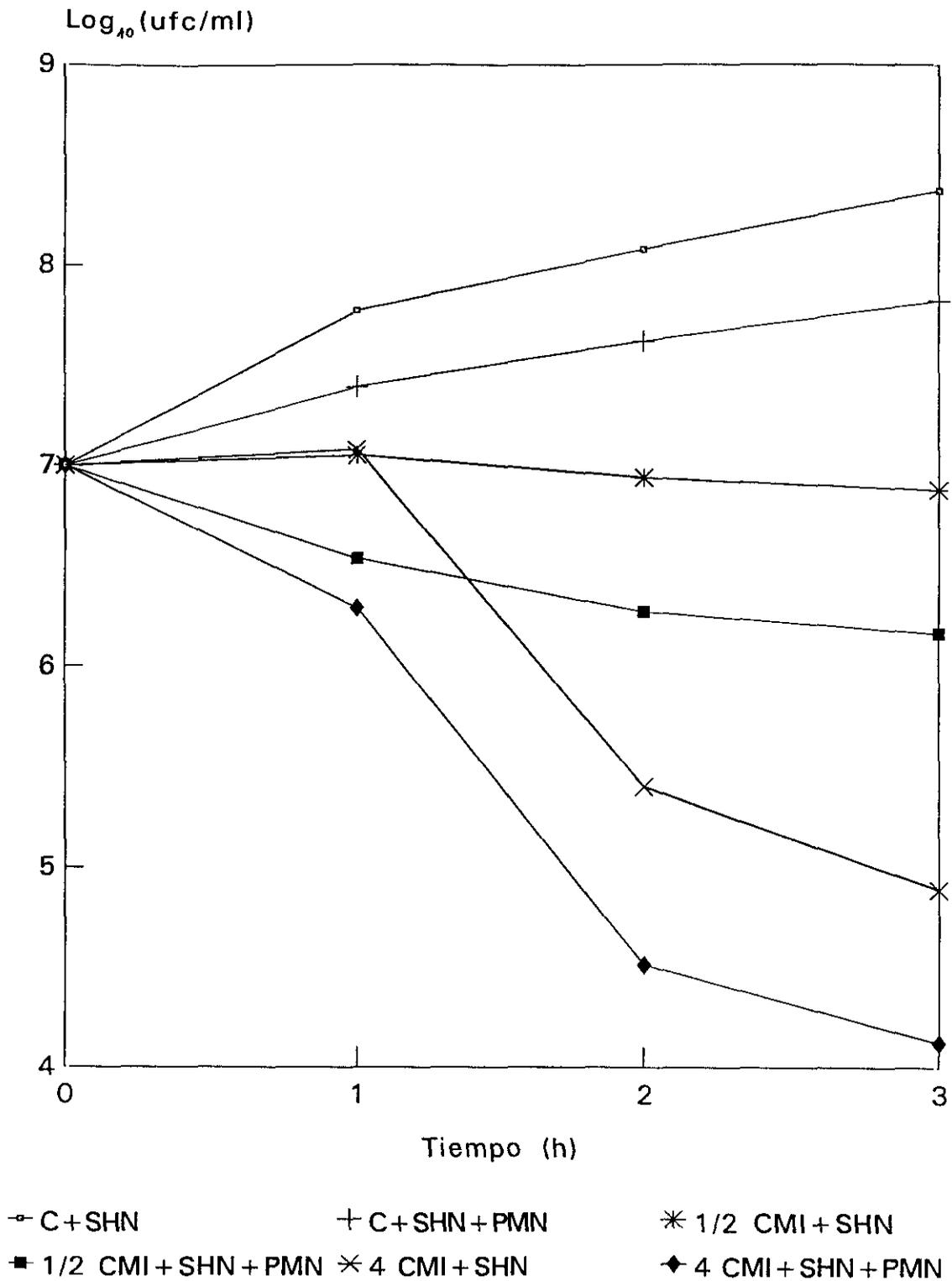
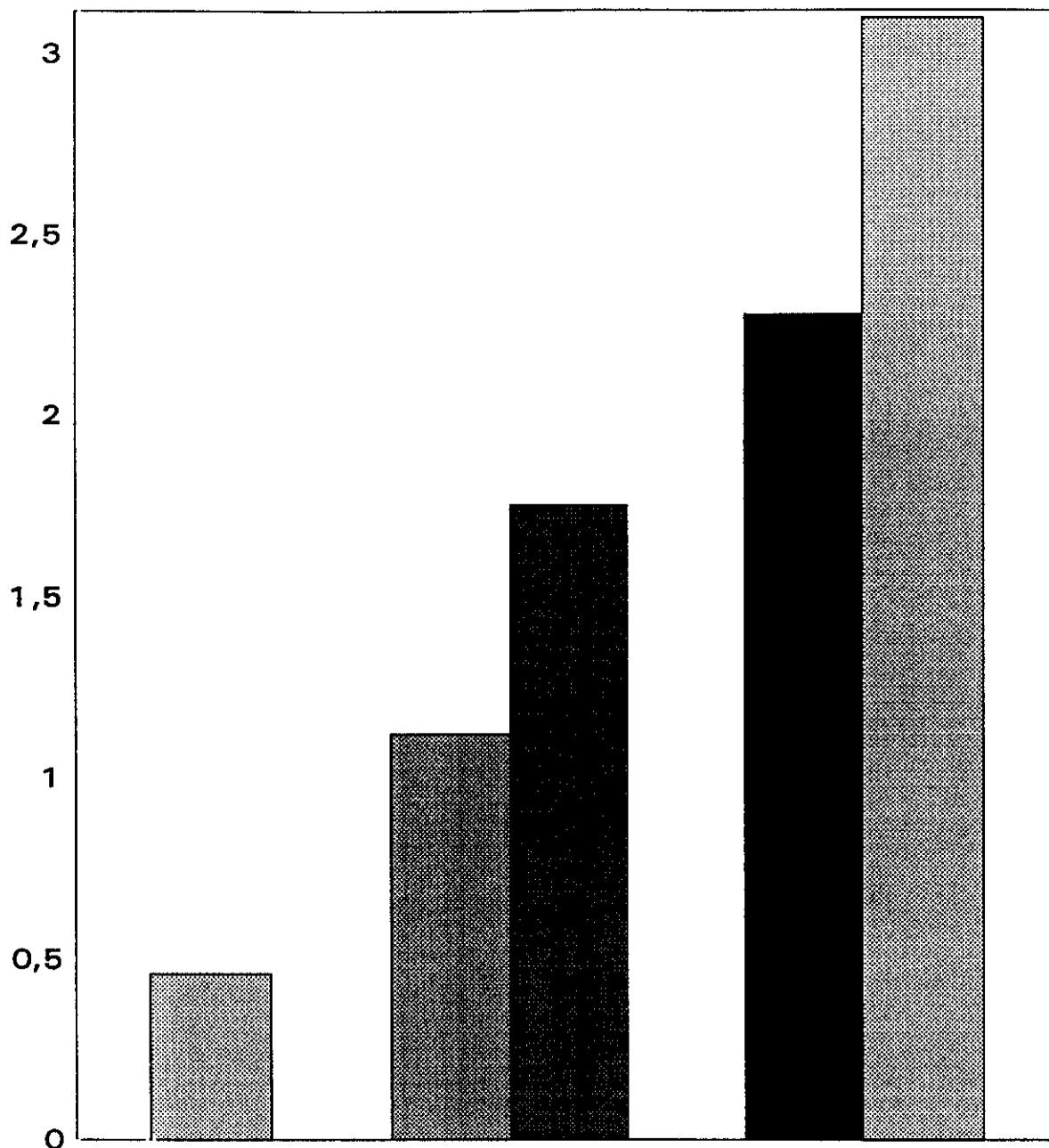


Figura 9.a. Cinéticas de letalidad de *E. coli* con 1/2 y 4 CMI de imipenem en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

PMN+ SHN
 1/2 CMI+ SHN
 1/2 CMI+ SHN+ PMN
 4 CMI+ SHN
 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 9.b. Reducción de *E. coli* viables debido a la exposición de la bacteria a imipenem (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

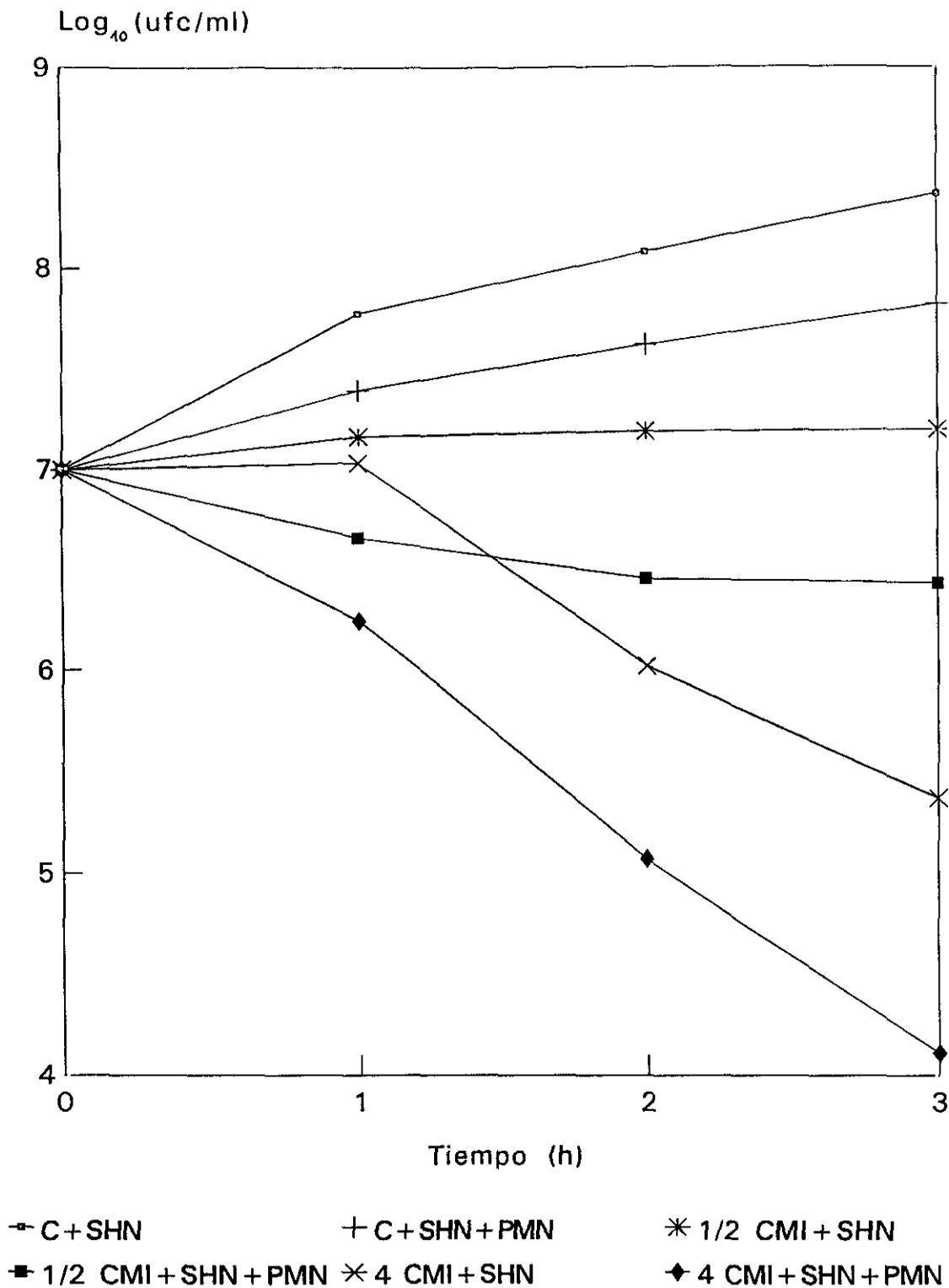
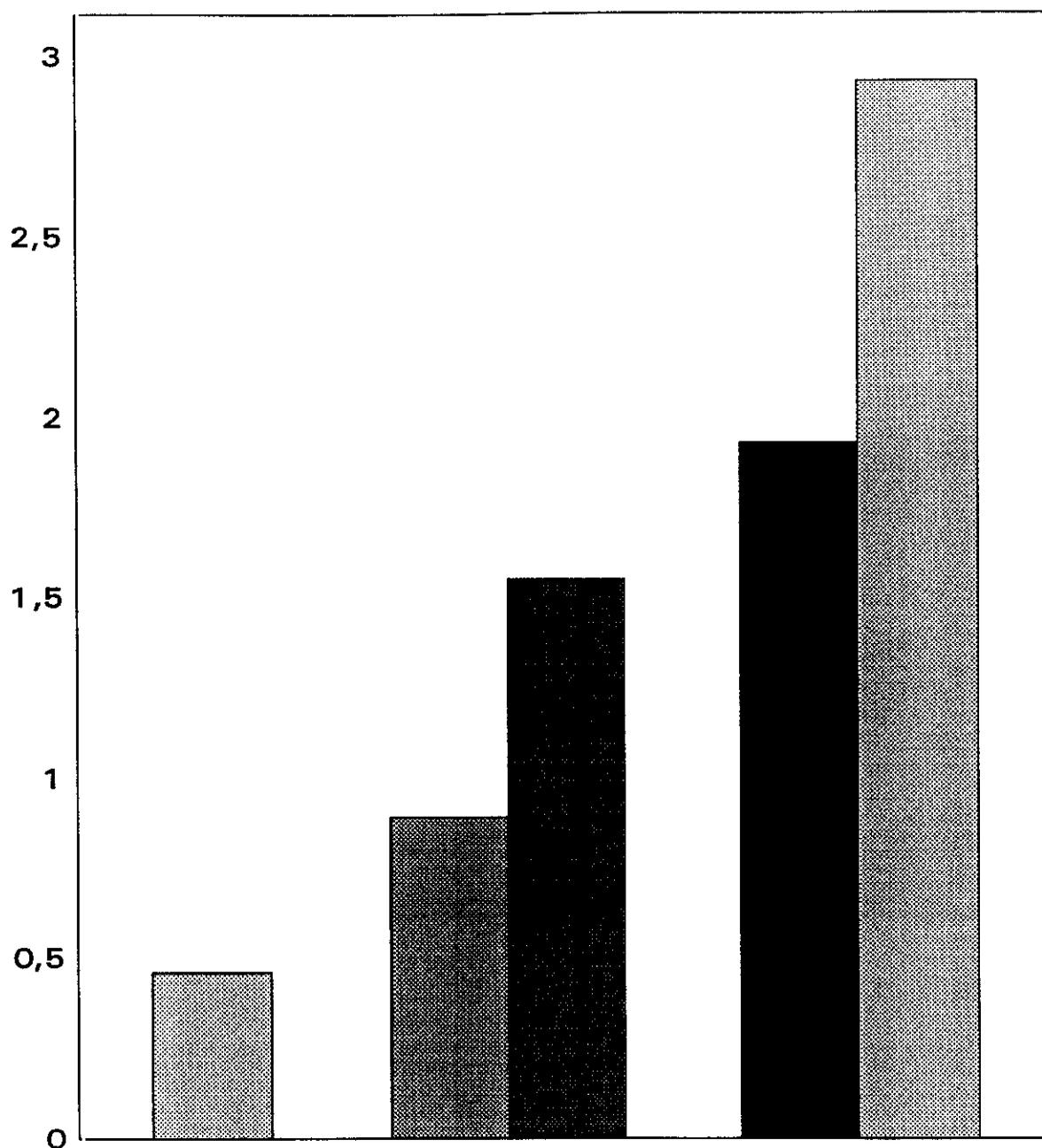


Figura 10.a. Cinéticas de letalidad de *E. coli* con 1/2 y 4 CMI de meropenem en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

PMN+ SHN
 1/2 CMI+ SHN
 1/2 CMI+ SHN+ PMN

4 CMI+ SHN
 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 10.b. Reducción de E. coli viables debido a la exposición de la bacteria a meropenem (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

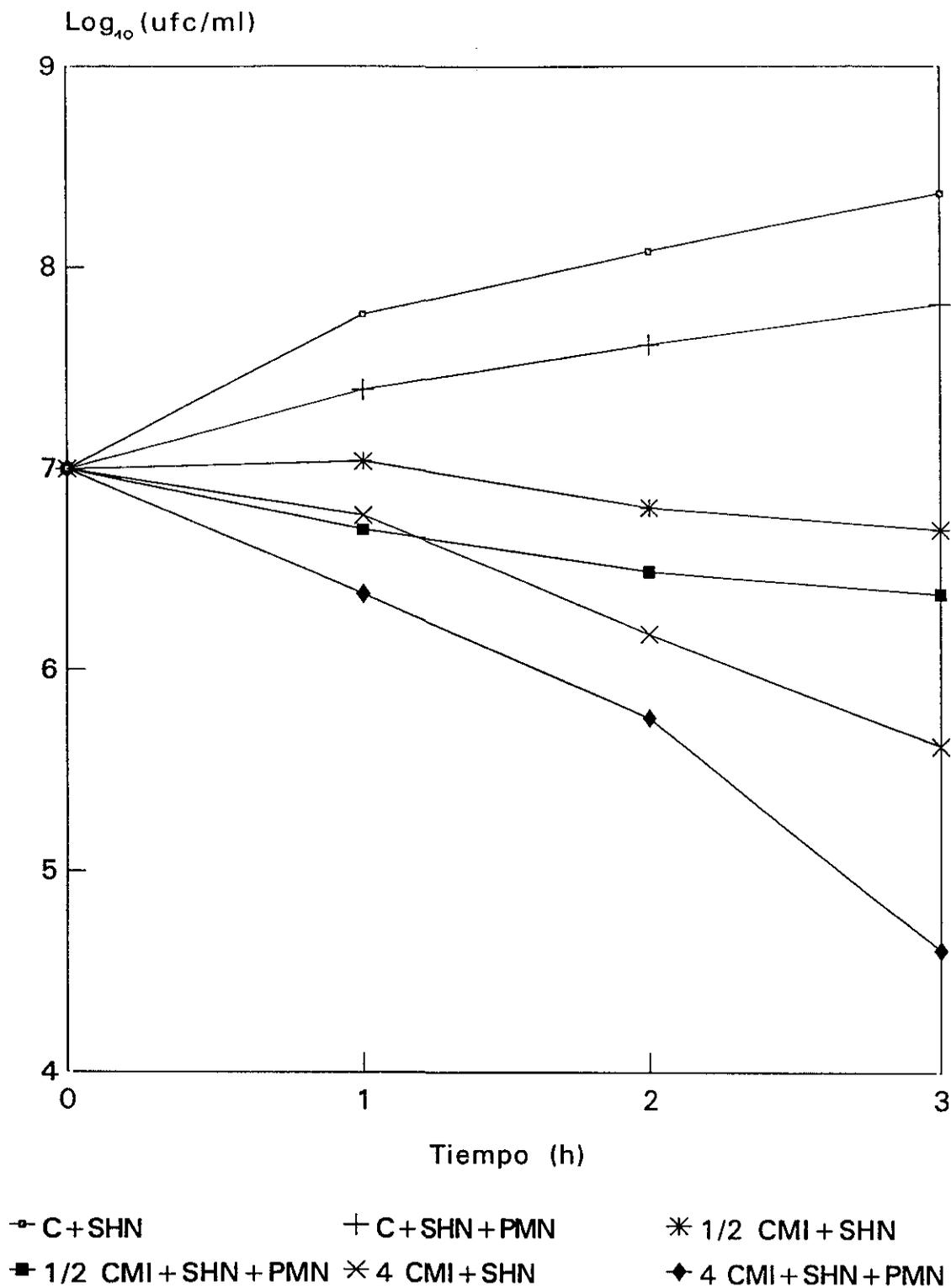
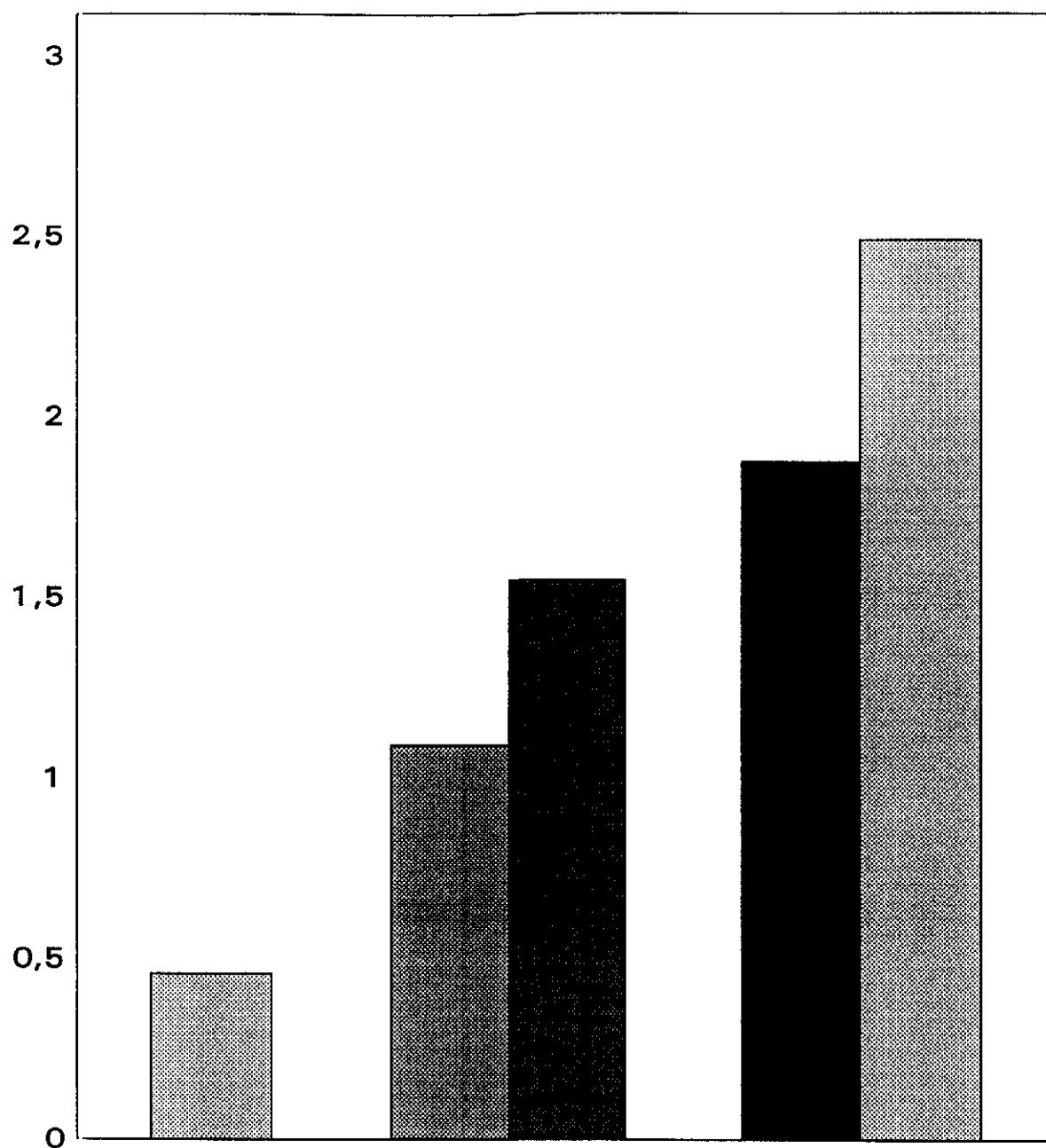


Figura 11.a. Cinéticas de letalidad de *E. coli* con 1/2 y 4 CMI de cefepime en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

PMN+ SHN
 1/2 CMI+ SHN
 1/2 CMI+ SHN+ PMN
 4 CMI+ SHN
 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 11.b. Reducción de E. coli viables debido a la exposición de la bacteria a cefepime (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

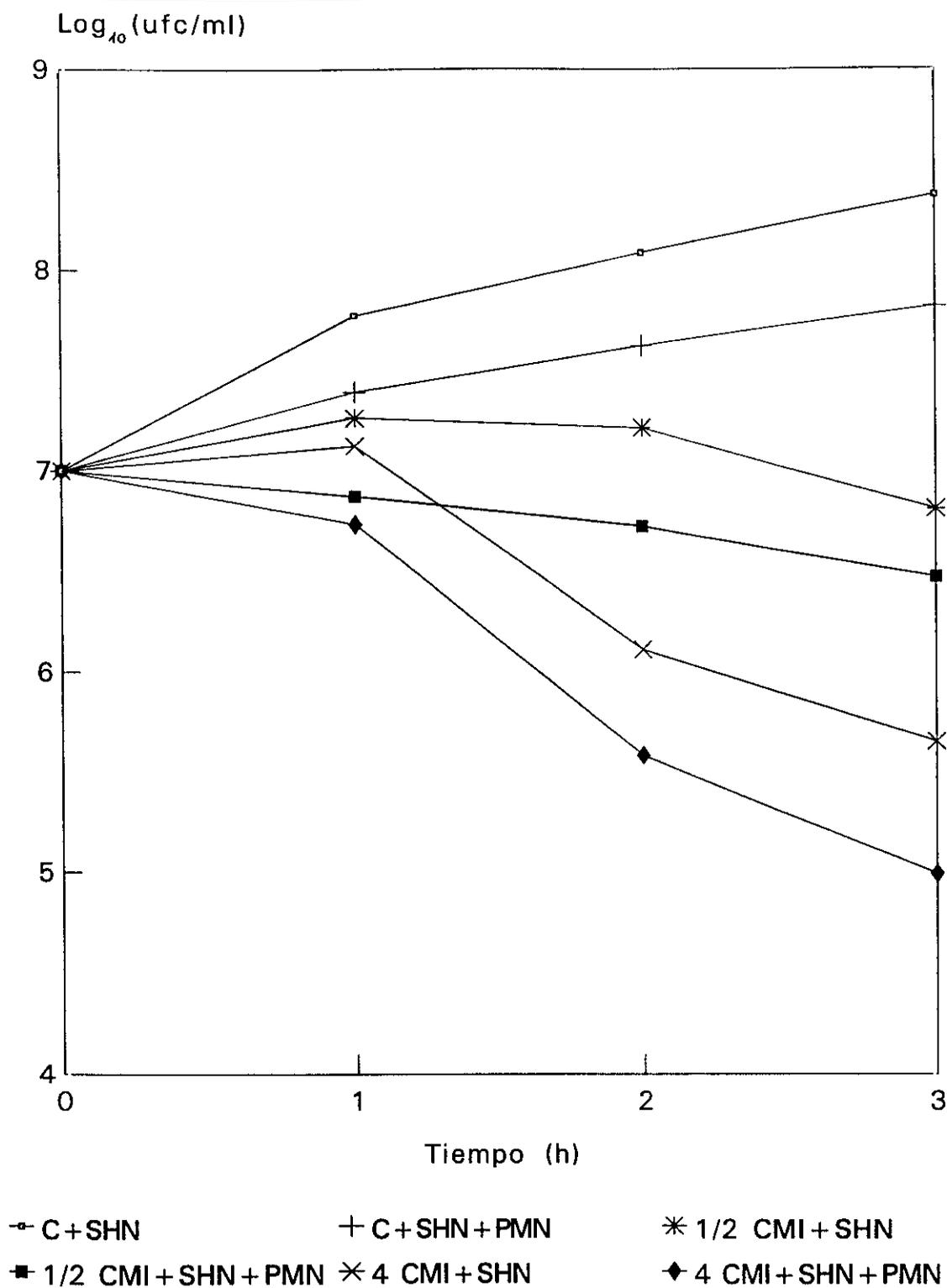
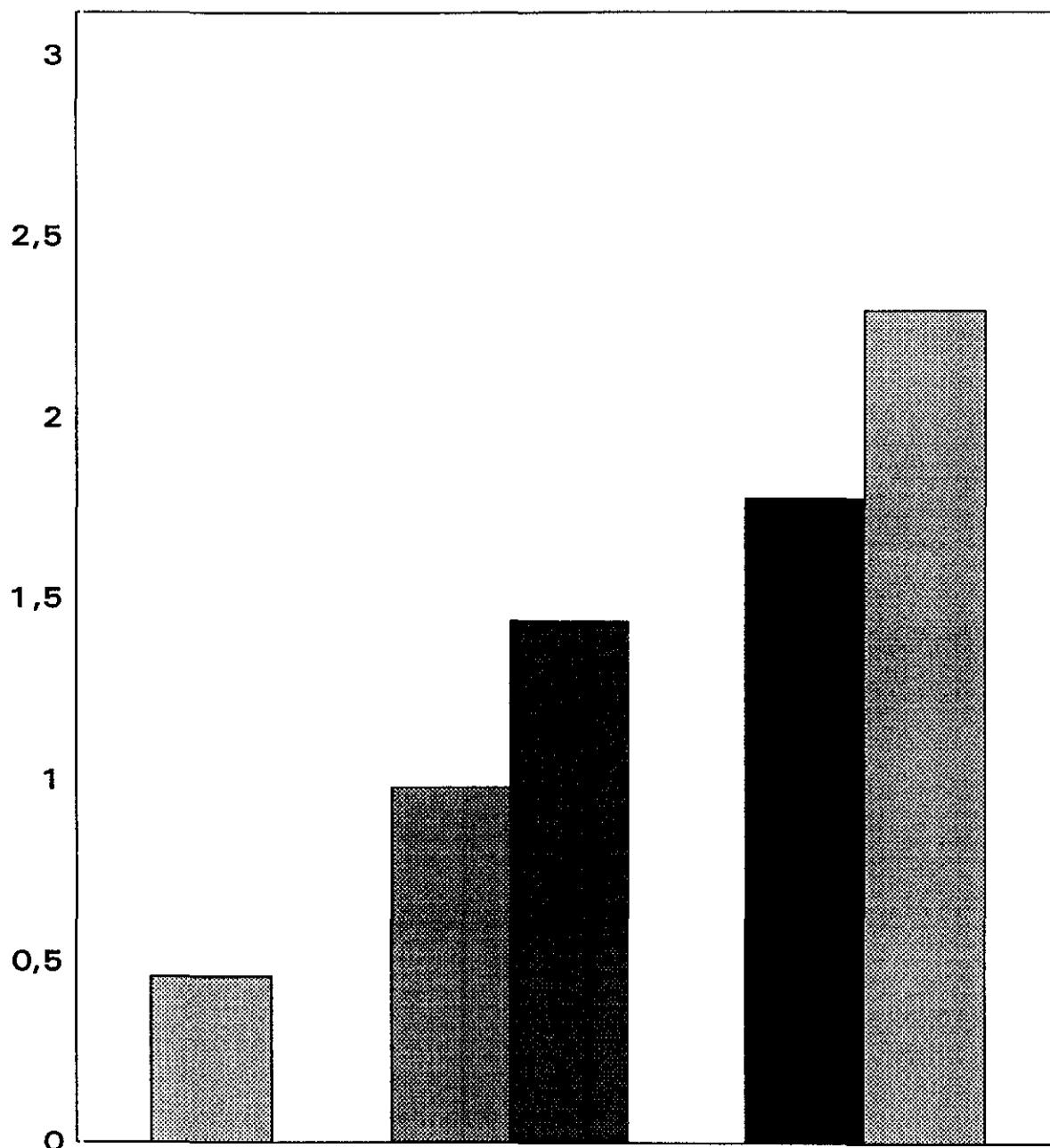


Figura 12.a. Cinéticas de letalidad de *E. coli* con 1/2 y 4 CMI de cefpodoxima en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

PMN+ SHN
 1/2 CMI+ SHN
 1/2 CMI+ SHN+ PMN
 4 CMI+ SHN
 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 12.b. Reducción de *E. coli* viables debido a la exposición de la bacteria a cefpodoxima (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

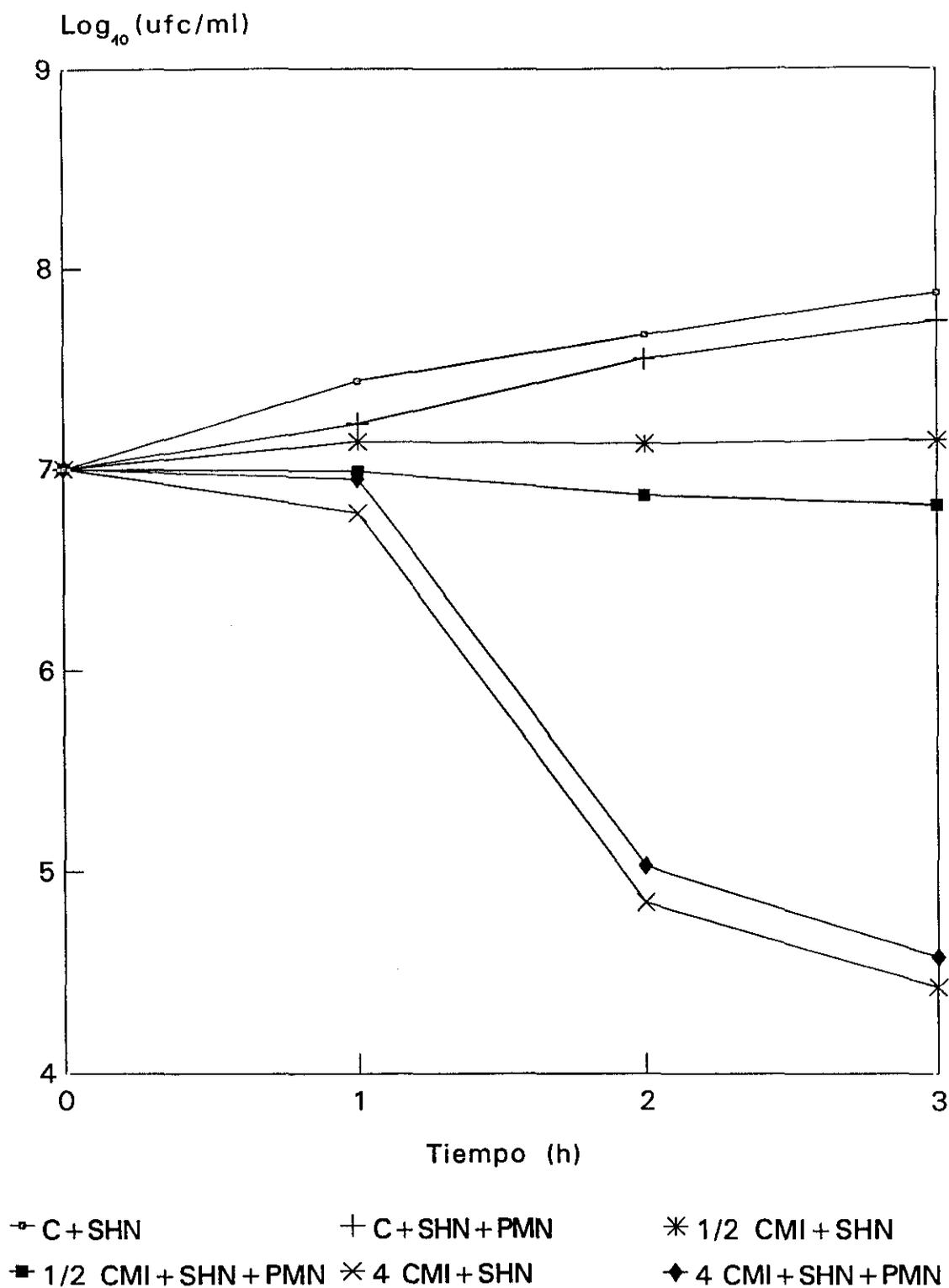


Figura 13.a. Cinéticas de letalidad de *S. aureus* con 1/2 y 4 CMI de imipenem en presencia y ausencia de PMNs.

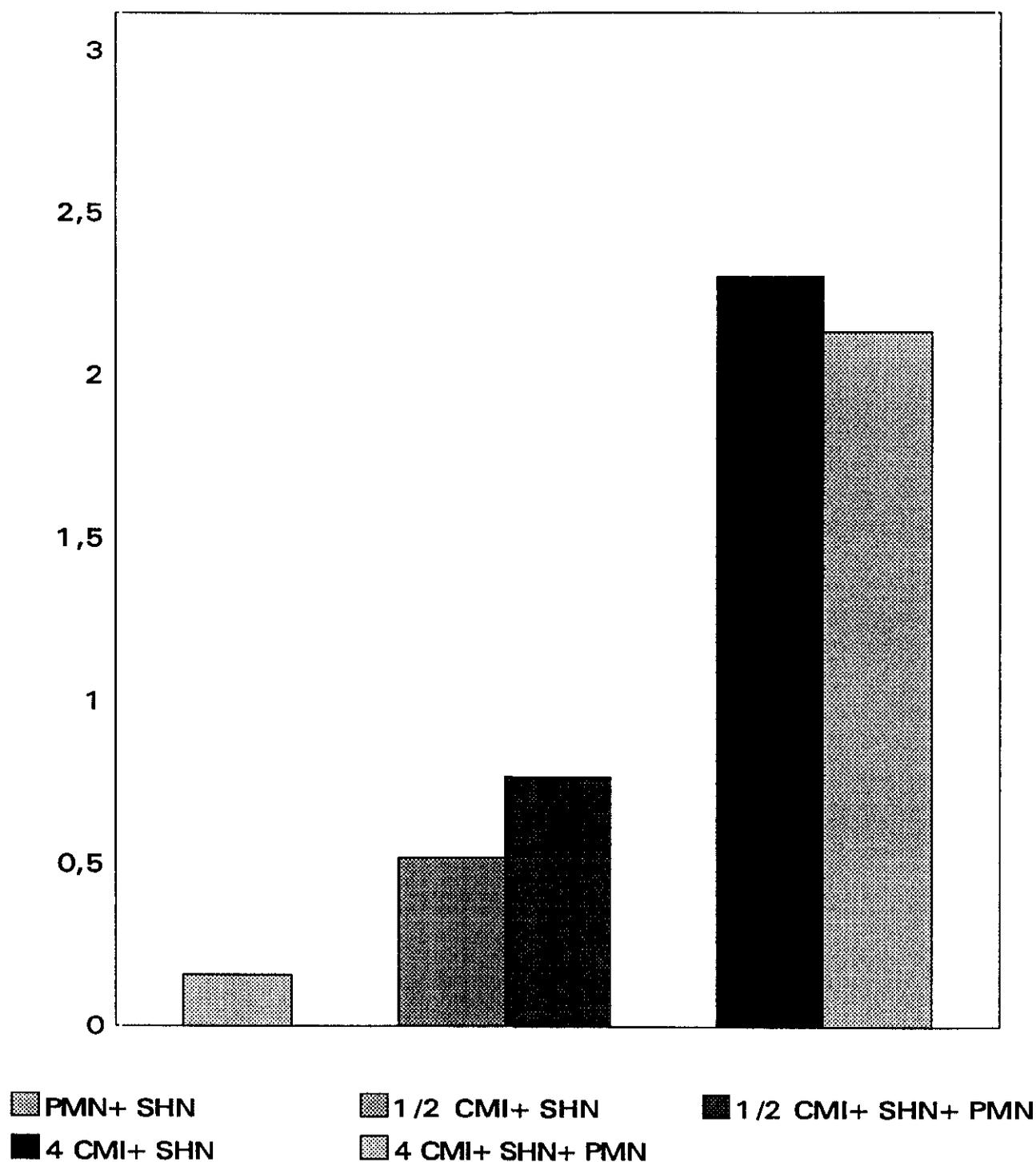
Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

Figura 13.b. Reducción de *S. aureus* viables debido a la exposición de la bacteria a imipenem (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

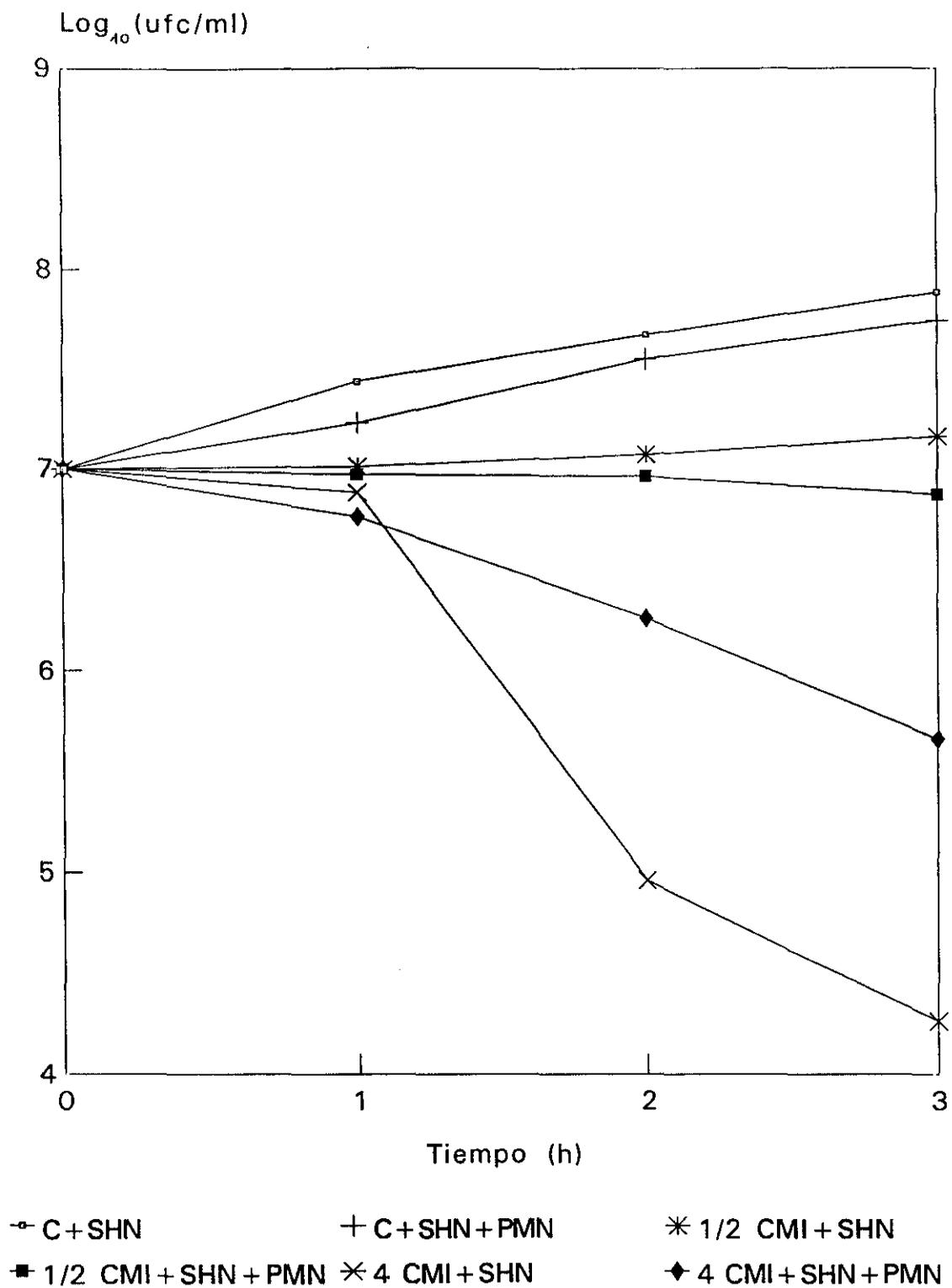
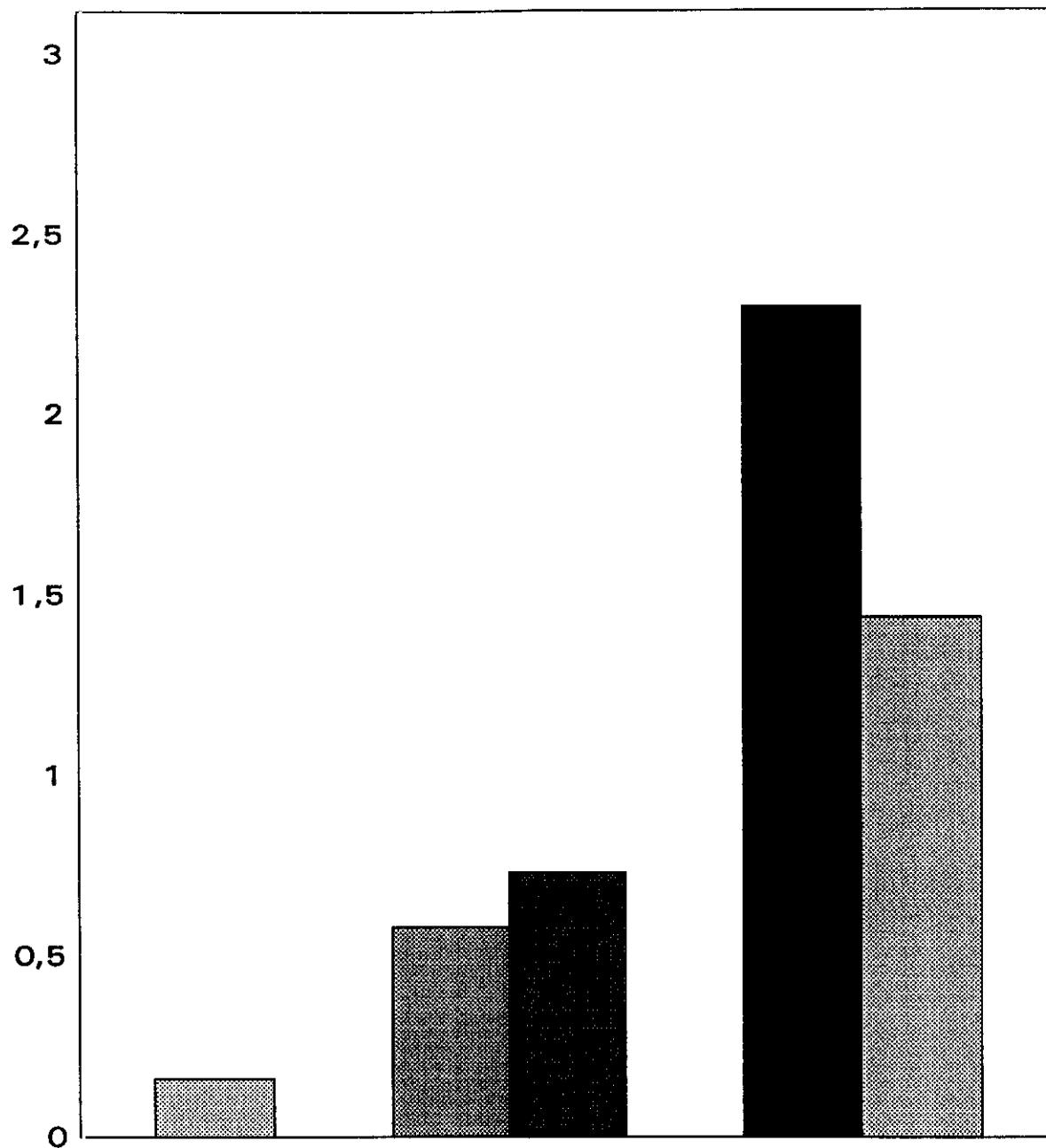


Figura 14.a. Cinéticas de letalidad de *S. aureus* con 1/2 y 4 CMI de meropenem en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

■ PMN+ SHN

■ 1/2 CMI+ SHN

■ 1/2 CMI+ SHN+ PMN

■ 4 CMI+ SHN

■ 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 14.b. Reducción de *S. aureus* viables debido a la exposición de la bacteria a meropenem (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

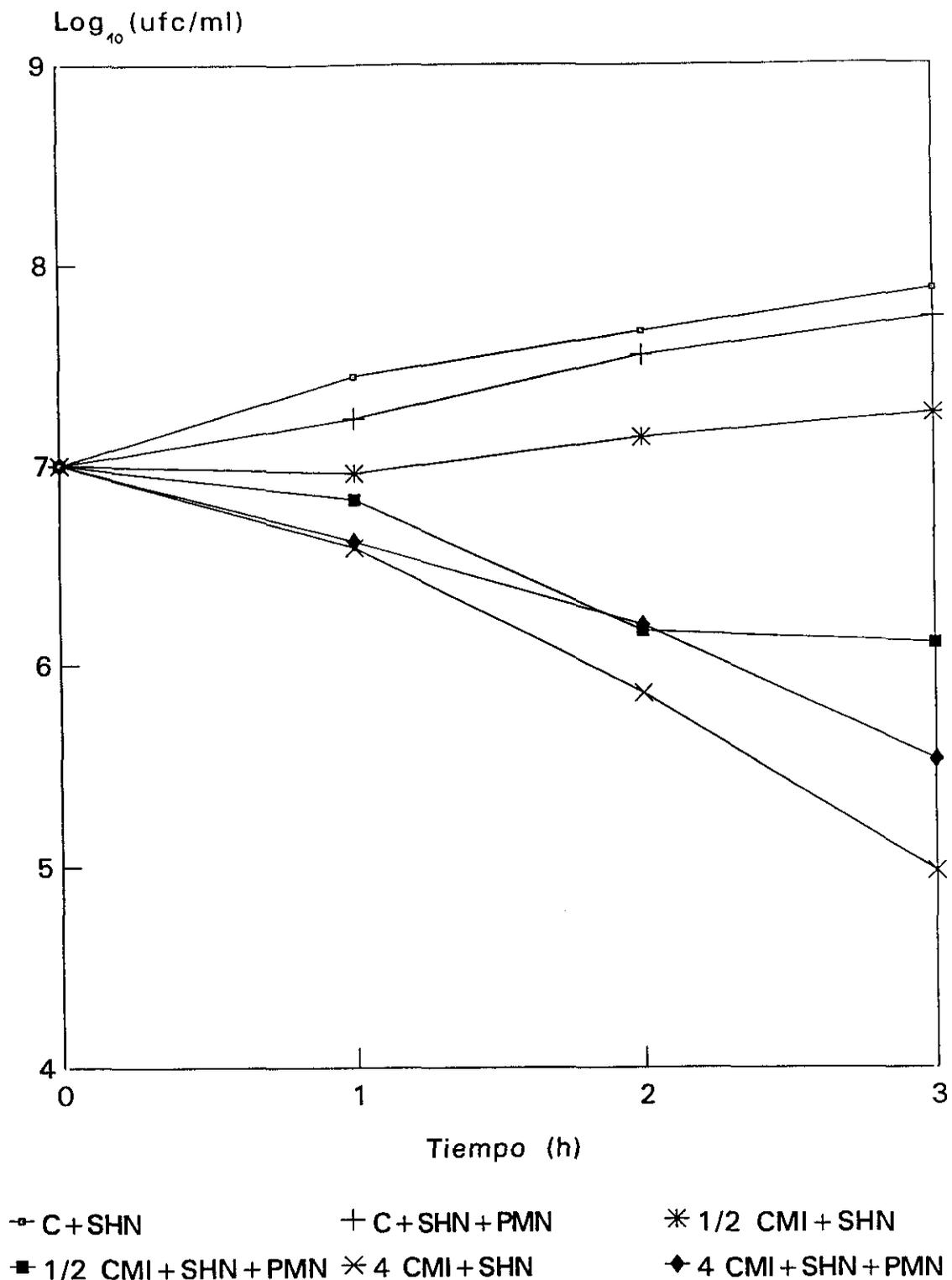
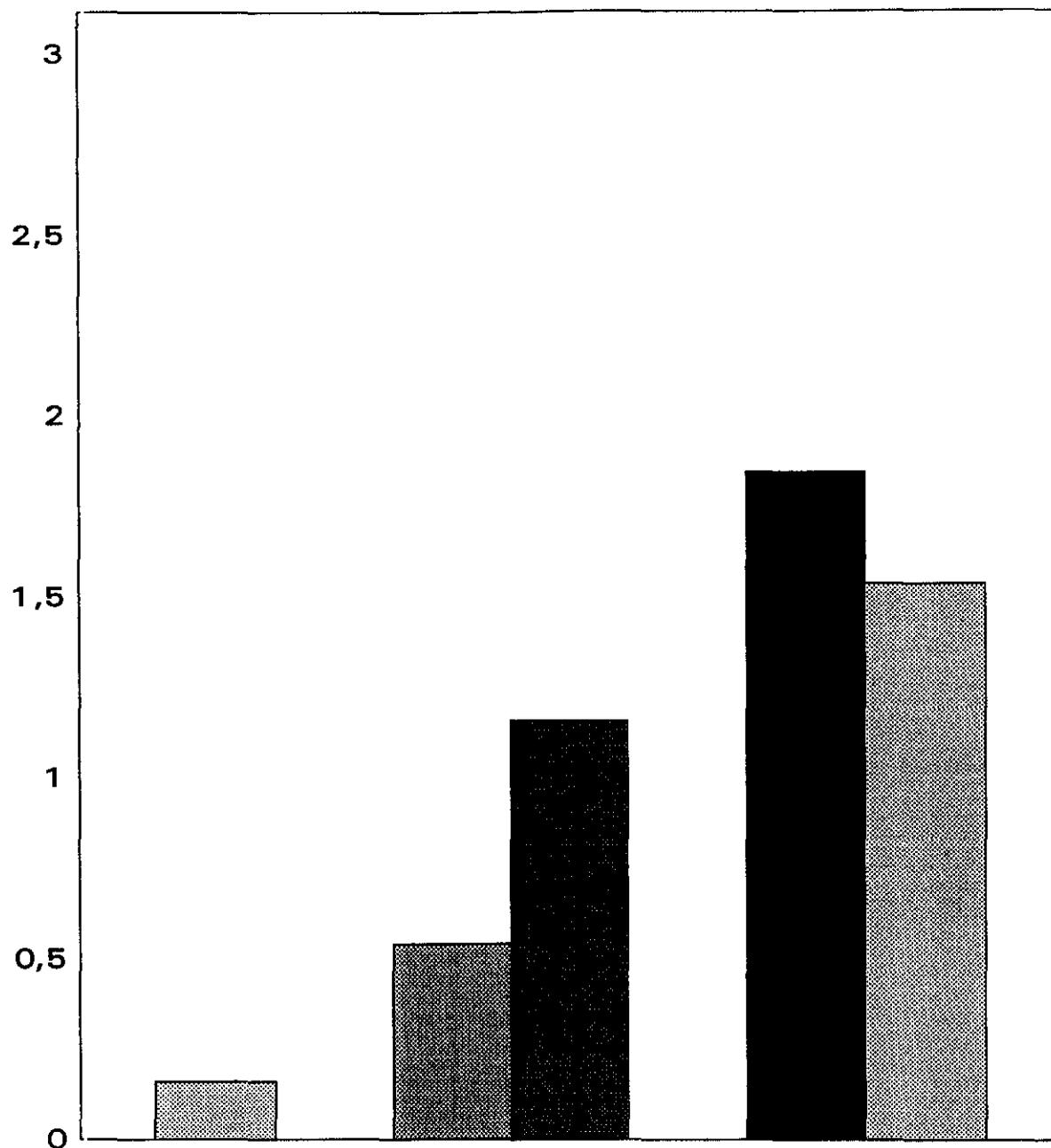


Figura 15.a. Cinéticas de letalidad de *S. aureus* con 1/2 y 4 CMI de cefepime en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

■ PMN+ SHN

■ 1/2 CMI+ SHN

■ 1/2 CMI+ SHN+ PMN

■ 4 CMI+ SHN

■ 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 15.b. Reducción de *S. aureus* viables debido a la exposición de la bacteria a cefepime (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

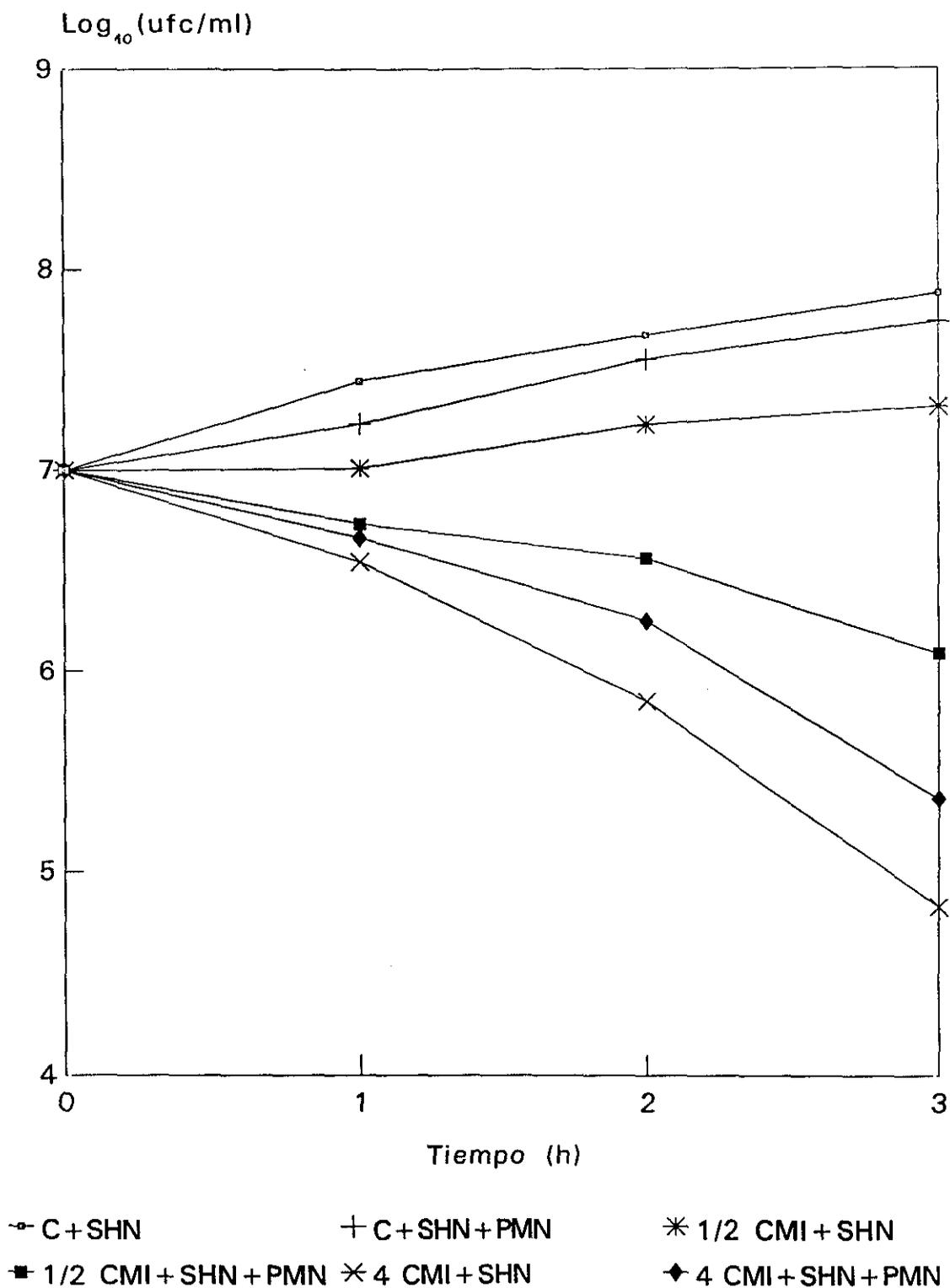
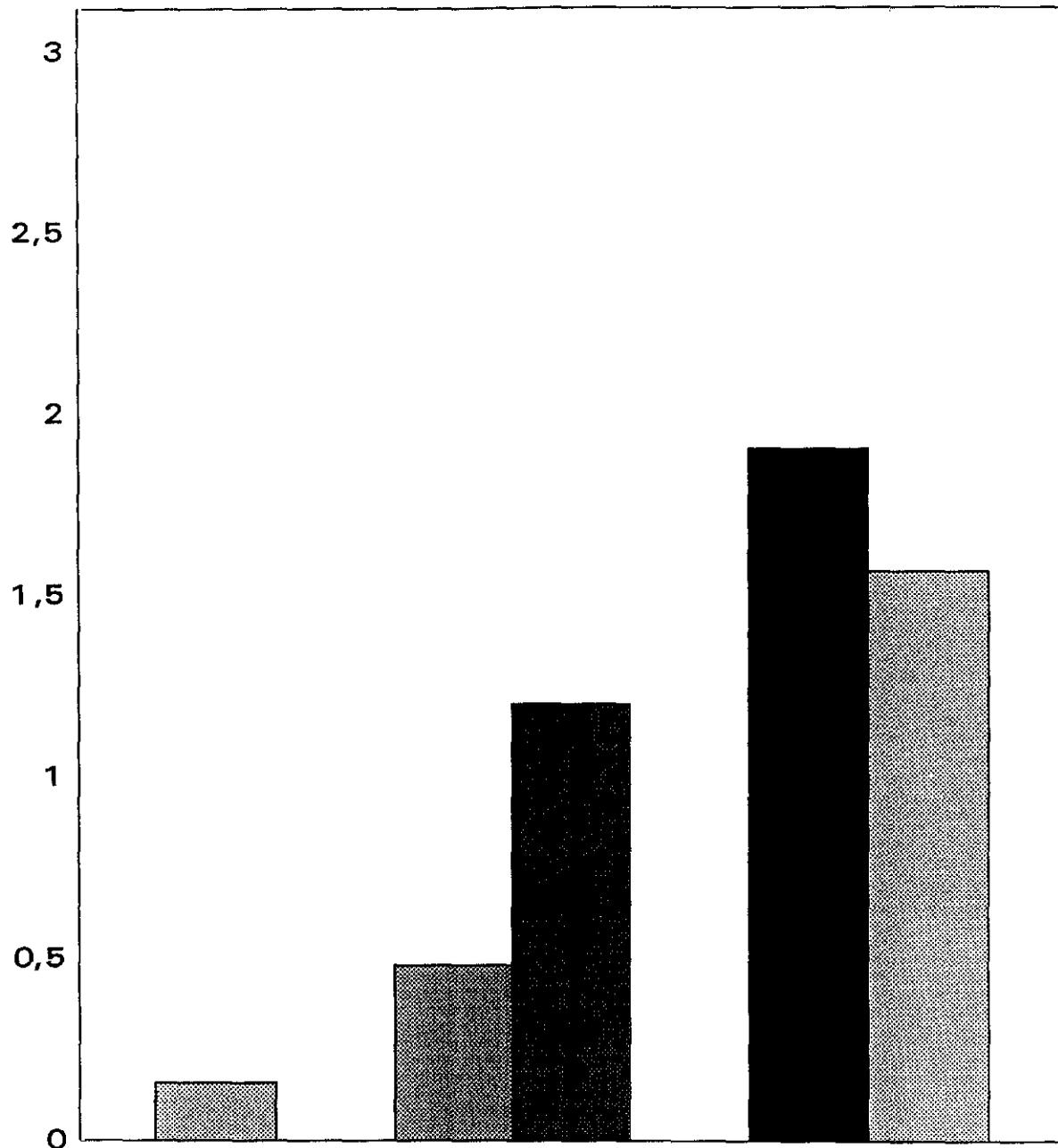


Figura 16.a. Cinéticas de letalidad de S. aureus con 1/2 y 4 CMI de cefpodoxima en presencia y ausencia de PMNs.

Reducción viables (Log_{10} UFC/ml)

PMN+ SHN
 1/2 CMI+ SHN
 1/2 CMI+ SHN+ PMN
 4 CMI+ SHN
 4 CMI+ SHN+ PMN

Figura 16.b. Reducción de *S. aureus* viables debido a la exposición de la bacteria a cefpodoxima (1/2 y 4 CMI), PMNs o ambos factores.

* Los valores, expresados en Log_{10} UFC/ml, se refieren al descenso medio obtenido durante las tres horas del ensayo, en el número de viables respecto a los microorganismos control (sin incubación con PMNs ni antibiótico).

DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DEL MÉTODO EXPERIMENTAL.

El método experimental empleado en este trabajo para el estudio del efecto postantibiótico leucocitario, así como para el estudio de la actividad bactericida del leucocito en presencia continua de antibiótico, se basa en la técnica descrita por McDonald y Pruul, autores que han definido el efecto PALE.

No obstante, hemos realizado algunas modificaciones en la metodología, con el propósito de adecuar los medios de los que disponemos con los objetivos propuestos. Por tanto, este análisis de la metodología se centrará en aquellas partes más relevantes del protocolo experimental.

1.1. Preparación del inóculo.

Iniciamos el protocolo experimental a partir de caldo que contiene bacterias en fase de crecimiento exponencial, preparado a partir de una dilución de un cultivo *overnight*, que se incuba en medio fresco 2 ó 3 horas. En numerosos estudios no se sigue este proceso sino que a partir de un cultivo *overnight*, directamente se inicia el ensayo, tomando una muestra y diluyéndola en el medio adecuado para conseguir determinada población bacteriana. Hay estudios (128) que confirman que cualquiera de los dos procedimientos son válidos, porque no se altera la sensibilidad de la bacteria al antibiótico con el que posteriormente será tratada. En nuestro estudio, seguimos el primer procedimiento para asegurar que la población bacteriana estuviera en fase de crecimiento exponencial de forma uniforme, sincronizada y efectiva.

El caldo bacteriano se deja crecer hasta que alcanza una turbidez que, medida con el espectrofotómetro, tiene un valor de absorbancia, a 580 nm de luz visible, de 0.3 para *E. coli* y 0.25 para *S. aureus*, que supone unas 10^8 UFC/ml. La turbidez y el número de UFC/ml que supone pueden diferir entre los grupos de microorganismos y los propios aislados dentro de un grupo. Estas diferencias pueden ser debidas al tamaño de las células bacterianas, a la presencia de *slime*, cápsulas y otros componentes superficiales, a la agregación de los organismos o a la pérdida de viabilidad celular. Todas estas interferencias se agravan si la turbidez se mide por métodos como el de McFarland (129), que suponen una participación activa de la subjetividad del individuo en la medida. Para evitarlo se utilizó el espectrofotómetro y se hicieron, durante

pruebas previas, curvas de crecimiento en las que se relaciona absorbancia a 580 nm y número de unidades formadoras de colonias por mililitro para nuestras cepas.

1.2. Pretratamiento antimicrobiano y exposición continua de los microorganismos al antimicrobiano.

1.2.1. Pretratamiento antimicrobiano.

En el estudio de las alteraciones en la interacción entre los fagocitos y las bacterias, debidas a los efectos del antibiótico sobre estas, es esencial que cualquier efecto del antimicrobiano sobre el microorganismo pueda ser distinguido de un efecto del antibiótico sobre la fagocitosis. Esta distinción puede ser realizada por la exposición del microorganismo al antibiótico antes de ser incubada con los leucocitos.

Se hicieron pruebas previas para determinar qué tiempo de exposición al antibiótico y qué concentración del mismo resultarían adecuadas para el ensayo. Se concluyó que un pretratamiento de diez minutos era el tiempo máximo requerido para causar alteraciones en las bacterias sin que disminuyera el tamaño del inóculo inicial respecto del control. Valores por encima de 4 veces la CMI reducían igualmente, el inóculo inicial, mientras que esta era la máxima concentración que no resultaba letal. Por otra parte, las concentraciones de antibiótico empleadas en este estudio, tuvieron en cuenta la recomendación de administrar dosis que permitan que los niveles plasmáticos del antibiótico sean 4 a 10 veces mayores que la concentración mínima inhibitoria frente al patógeno (130). Por todo ello, elegimos concentraciones de 4xCMI de cada antimicrobiano empleado.

Tras el tratamiento, el antibiótico debe ser eliminado por dilución y centrifugación. La centrifugación a 1.200g es un método empleado habitualmente para eliminar y separar el antimicrobiano de las bacterias aunque el descenso de la temperatura, las alteraciones mecánicas y el alejamiento temporal de las bacterias del medio nutritivo provocan un pequeño descenso en el número de viables (131). Sin embargo, este es un inconveniente menor, ya que tanto los cultivos controles, como los tratados con antimicrobiano, sufren el mismo proceso. Además se verificó experimentalmente, que el número de UFC/ml contadas en placa, correspondían a lo esperado para el valor de la absorbancia.

1.2.2. Exposición continua de los microorganismos al antimicrobiano.

Dos concentraciones de antibiótico, una suprainhibitoria (4xCMI, la misma concentración empleada en el estudio del efecto PALE) y otra subinhibitoria (1/2xCMI), fueron empleadas en el estudio de la actividad bactericida de leucocitos PMNs sobre bacterias en presencia continua de antimicrobianos, con el propósito de comparar el efecto del antimicrobiano sobre la actividad leucocitaria en fase postantibiótica, con el efecto sobre la actividad bactericida de los leucocitos en presencia continua de antibiótico, y por otra parte, poder comparar el efecto de dos concentraciones distintas de antimicrobiano sobre la actividad de los leucocitos PMNs.

Una vez preparado el inóculo y ajustado a 10^8 UFC/ml, se siguió el mismo proceso de incubación en baño de agitación a 37 °C durante diez minutos, dilución y posterior centrifugación, para poder establecer comparaciones entre las cinéticas de crecimiento en fase postantibiótica y en presencia continua de antibiótico.

1.3. Extracción de leucocitos PMNs.

El método de extracción de los PMNs está basado en la lisis de eritrocitos mediante tratamiento con cloruro amónico y posterior purificación por centrifugación diferencial en HBSS (124). Por esta técnica se obtiene una alta concentración de PMNs morfológica y funcionalmente intactos a partir de un pequeño volumen de sangre completa. Se pueden obtener hasta 4×10^6 células de 1 ml de sangre, ya que la pérdida celular es menor que en las técnicas de separación que utilizan gradientes de densidad. Además la rapidez con la cual se pueden obtener los polimorfos es un aspecto importante, solamente se requieren 45 minutos para la extracción total de las células a partir de sangre completa. El segundo lavado de los PMNs en NH_4Cl , antes de resuspenderlos en HBSS, elimina por completo los eritrocitos presentes. Aunque la centrifugación diferencial no proporciona el grado de pureza que se ha atribuido a algunas técnicas de separación en gradiente de densidad (>95%), tiene la ventaja de exponer a los PMNs al mínimo estímulo posible. Se ha especulado sobre si el cloruro amónico podría alterar el balance electrolítico de los PMNs, sin embargo se demostró en un estudio (132), que los efectos eran reversibles cuando las células se resuspendían en medio fisiológico.

Se recomienda EDTA potásico como anticoagulante, ya que el citrato y la sangre heparinizada no permiten el aislamiento de PMNs según este método con la misma eficacia. Además el citrato y la heparina son estimulantes del estallido respiratorio de los PMNs.

En los últimos años, varios autores han expresado su preocupación acerca del posible efecto de los polímeros de gradiente de densidad sobre el metabolismo o propiedades de superficie de los PMNs. Por ejemplo, el dextrano inhibe la migración de PMNs en agarosa (133), estimula el metabolismo celular (134) y también se une en parte irreversiblemente a la célula alterando la carga superficial (135). El Ficoll o Percoll pueden provocar la pérdida de la capacidad de adherencia sobre superficies de plástico o cristal (135,136). El Ficoll-Hypaque altera la capacidad migratoria de los granulocitos en agarosa (137) y puede interferir con el transporte de sodio de los PMNs (138).

Otros problemas son la posible contaminación de algunos lotes de Ficoll-Hypaque con lipopolisacáridos bacterianos, que pueden alterar morfológica y funcionalmente a los PMNs aislados por este método (139), y pequeños cambios en el proceso de manufacturación de los polímeros de gradiente de densidad, que producen alteraciones importantes en las propiedades de separación (140). Aunque es importante considerar los efectos de todos estos agentes sobre las funciones de los PMNs, hay que tener presente que muchos investigadores emplean estos métodos de aislamiento con éxito.

Por último, enfrentamos diez bacterias por PMN porque un rango de 6 a 12 microorganismos por leucocito se suelen encontrar en los ensayos clínicos (141-143).

1.4. Lisis de los leucocitos y efecto del pH en las bacterias.

En experimentos que requieren la lisis de los leucocitos PMNs algunos autores utilizan el choque osmótico en agua destilada a temperatura ambiente (144) o a 0 °C (145). Este método de lisis parece ser el menos nocivo para los microorganismos intracelulares, sin embargo la lisis completa de PMNs es difícil de alcanzar. Una baja osmolaridad junto con un elevado pH y temperatura, ocasiona la lisis de los PMNs en orina (146).

Gargan et al. (126) investigaron el pH y la temperatura óptima del agua destilada, necesarios para lisar totalmente los PMNs. El 87% de los PMNs fueron lisados después de permanecer cinco minutos en agua destilada estéril a 37 °C y pH 10, mientras que a pH 11, el porcentaje de lisis fue del 99.5%. La conclusión de este trabajo afirma que un sistema eficaz para lisar los PMNs sin producir daños en las bacterias intracelulares, es emplear agua destilada a un elevado pH y a 37 °C.

En este estudio, hemos llevado a cabo la lisis de PMNs, basándonos en el método de Gargan et al. El porcentaje de lisis de PMNs que alcanzamos es aproximadamente del 99%. El pH del agua destilada fue 10.8 puesto que estos mismos autores advierten que mientras S. aureus (opsonizado y no opsonizado) mantuvo su viabilidad a valores de pH mayores de 11, con E. coli opsonizado se debe procurar un especial cuidado para que el pH del agua no exceda de 11, ya que es sensible a pH superiores a 11.2. Este pH es el adecuado para lisar los PMNs (124) sin que se perjudique la viabilidad bacteriana, como se desprende de que la cinética de las bacterias control sea la esperada para nuestras cepas. Hay estudios (128,147) que determinan que miembros de la familia Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, estafilococos y enterococos pueden permanecer más de seis horas en agua o solución salina antes de su inoculación en placas de agar sin que haya alteración en el recuento de UFC/ml. Nosotros procuramos sembrar en menos de 15 minutos, tal y como recomiendan las normas del N.C.C.L. (148).

2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

2.1. Efecto Postantibiótico Leucocitario (PALE).

2.1.1. Efecto del pretratamiento antimicrobiano sobre la cinética de crecimiento de E.coli y S. aureus.

2.1.1.1. Efecto del pretratamiento antimicrobiano de E. coli.

La supresión del crecimiento bacteriano es el principal y más claro efecto que los antimicrobianos pueden presentar tanto *in vitro* como *in vivo*. La supresión del crecimiento bacteriano puede ocurrir durante un cierto tiempo después de la exposición de la bacteria al antibiótico. El término efecto postantibiótico (PAE), ha llegado a ser el más ampliamente empleado para describir este fenómeno.

El mecanismo preciso por el que se establece el PAE es desconocido, pero múltiples factores deben estar implicados. Aunque el término PAE fue definido para enfatizar el hecho de que la previa exposición al fármaco es la causante del fenómeno, otras teorías se inclinan a destacar el papel de las concentraciones subinhibitorias del antibiótico, al que están expuestas las bacterias tras la eliminación del antibiótico del medio, en la presentación de este fenómeno. Algunos autores sugieren que el tiempo necesario para la liberación del antibiótico de sus receptores sería el tiempo de recuperación del crecimiento bacteriano (62), para otros autores, el PAE sería el tiempo de resíntesis de las proteínas y enzimas afectados por la acción del fármaco (149). Otras causas posibles que se citan son la difusión del antibiótico desde sus receptores, la modificación de la síntesis del DNA, la producción de factores endógenos del tipo de los que se implican en la respuesta SOS de E. coli, etc. (62).

Los resultados obtenidos en los últimos diez años sobre el efecto PAE conducen a cuatro conceptos generales (62,150,151).

1. La actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) es un prerrequisito para un PAE.

2. El PAE y su duración están correlacionados con la concentración del antimicrobiano y la duración de la exposición hasta una respuesta máxima.

3. Inhibidores de la síntesis de proteínas (macrólidos, tetraciclinas y aminoglicósidos) inhibidores de RNA polimerasa (rifampina) e inhibidores de la DNA-girasa (quinolonas) presentan un PAE de larga duración frente a organismos Gram-positivos y Gram-negativos.

4. Los antibióticos betalactámicos provocan un PAE menor que es dependiente del tipo de organismo diana empleado. Mientras que PAEs de hasta algunas horas de duración se obtienen con organismos Gram-positivos, con organismos Gram-negativos no se obtienen PAEs o se consiguen con altas concentraciones del betalactámico. Los carbapenemes son los únicos antibióticos betalactámicos que poseen un efecto postantibiótico no solo con organismos Gram-positivos sino también con Gram-negativos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, después del pretratamiento de E. coli

durante 10 minutos con 4xCMI de imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima concuerdan con los resultados, anteriormente expuestos, de otros autores, es decir, no hallamos una supresión del crecimiento postantibiótico o PAE. Los antimicrobianos de este estudio, todos ellos betalactámicos, son incapaces de provocar PAE sobre E. coli a la concentración estudiada. Distintos autores han señalado la necesidad de altas concentraciones de betalactámicos, desde 32 a 256 veces la CMI, para llegar a provocar pequeños PAEs frente a miembros de la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonas aeruginosa (150,152,153). Además el breve período de exposición al antimicrobiano, diez minutos, no se traduce en una supresión del crecimiento postantibiótico ni siquiera en el caso de los carbapenemes, imipenem y meropenem, que si muestran PAEs de varias horas de duración frente a bacilos Gram-negativos, especialmente P. aeruginosa, con mayores tiempos de exposición de las bacterias al antibiótico (62,154,155).

2.1.1.2. Efecto del pretratamiento antimicrobiano de S. aureus.

La exposición de microorganismos Gram-positivos a antibióticos betalactámicos, puede provocar un retraso en el crecimiento bacteriano, en diferentes condiciones experimentales, tanto con largos como con cortos pretratamientos, así como con concentraciones sub-CMIs y concentraciones mayores de la CMI (156,157). En un medio sin antimicrobianos los cocos se dividen, se separan y forman *clusters* por la división en planos multidireccionales. La agregación de S. aureus en un caldo es de cuatro cocos al principio del ensayo y de tres después de unas cuatro horas de incubación, de esta manera, el número de UFC a medida que avanzamos en el tiempo aumenta tanto por la multiplicación de los microorganismos como por el descenso en la agregación (158). Cuando se exponen los cocos a los antimicrobianos se altera el equilibrio de la división y las células se multiplican pero no pueden separarse (11). En general, los antimicrobianos betalactámicos a concentraciones entre 2-8 veces la CMI disparan el mecanismo de lisis y la desintegración celular de los estafilococos (12).

Nuestros resultados señalan el retraso en el crecimiento de S. aureus, después de una exposición de 10 minutos con 4xCMI de imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima. Las diferencias entre las cinéticas de crecimiento de S. aureus control y S. aureus pretratado, fueron mayores en el caso de imipenem y meropenem. El

pretratamiento con los dos carbapenemes provocó durante las tres horas de incubación una diferencia de aproximadamente 1 log₁₀ de UFC/ml con los microorganismos control.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, aunque en diferentes condiciones experimentales, que señalan la existencia de efecto postantibiótico en el caso de imipenem (62,160), meropenem (161) que presenta PAE concentración-dependiente, cefpodoxima (162), así como otras cefalosporinas: cefdinir (163) y cefotaxima (160).

2.1.2. Efecto del suero sobre la cinética de crecimiento de E. coli y S.aureus.

2.1.2.1. Efecto del suero sobre E. coli y S. aureus control.

En las condiciones experimentales de este trabajo, el suero no influye en el crecimiento bacteriano, ni provoca un descenso debido a su acción bactericida, ni un aumento como nutriente enriquecedor del medio de cultivo. La eliminación de los microorganismos por los componentes del suero es un importante mecanismo de defensa contra las infecciones bacterianas. La muerte de las bacterias Gram-negativas por el sistema de complemento se debe al daño producido en la pared celular y a la posterior lisis al permitir a la lisozima alcanzar la membrana plasmática, destruyendo la capa de mucopéptido (164).

La activación del complemento puede ser desencadenado por las bacterias Gram-negativas de tres formas diferentes:

1. en presencia de anticuerpos naturales específicos se induce la vía clásica del complemento
2. los lipopolisacáridos de la pared celular son potentes activadores de la vía alternativa del complemento
3. la proteína C1 del complemento se puede unir directamente a la pared de ciertas bacterias y por lo tanto activar la vía clásica del complemento.

Algunas bacterias patógenas han desplegado mecanismos para evitar esta acción. Por ejemplo, la mayoría de las bacterias encapsuladas resisten la opsonización por el complemento y la fagocitosis subsecuente en ausencia de anticuerpos capsulares

específicos (165). La resistencia a la actividad bactericida del suero es un factor importante de las bacterias Gram-negativas en la medida en que es el responsable de la ineficacia de un importante mecanismo de defensa del hospedador, que es el ataque y muerte por el sistema de complemento. Solo unas especies entre los bacilos Gram-negativos que producen infecciones en el hombre son sensibles a los efectos bactericidas del suero. Solamente alrededor del 50% de las cepas de E. coli son sensibles al suero (16).

Se ha propuesto que las bacterias Gram-negativas pueden evitar la muerte por acción del suero si se presenta en el LPS material de alto peso molecular, que bloquearía el acceso del complejo C5b-9 a la membrana externa, previniendo así la lisis (165,166). Otros trabajos ponen de manifiesto que bacterias que presentan azúcares específicos en la cadena antigénica O de los lipopolisacáridos solo son opsonizados *in vitro* en presencia de anticuerpos específicos (167). En el caso de E. coli es necesario, la presencia de anticuerpos para incrementar la fijación del complemento de manera que se induzca la lisis (65).

E. coli y S. aureus crecidos en medio Müller-Hinton suplementado con un 20% de suero humano normal, fueron resistentes a la acción bactericida del suero. La concentración del suero en el medio no provocó un deterioro fatal de la envuelta bacteriana, pero si fue suficiente para lograr una eficiente fagocitosis, puesto que fueron halladas diferencias significativas en la actividad bactericida del leucocito en presencia y ausencia de suero. Estos resultados confirman otros estudios anteriores que señalan que E. coli es resistente al suero si este se encuentra en baja concentración (65,10); igualmente hay trabajos que evidencian que S. aureus es resistente al suero a bajas concentraciones (168).

Existen estudios (169) en los que se muestra que, para E. coli, la fijación del componente C3 del complemento sobre la envuelta celular es máxima (alrededor del 90%) a los diez minutos, cuando el suero se presenta en una concentración del 50%. Para concentraciones iguales o menores al 10%, tan solo se observa una fijación de menos del 40% al cabo de una hora de incubación (169). La concentración del suero resulta más importante para la fijación del componente C3 que el tiempo de exposición.

En el caso de S. aureus, hay estudios que muestran que un 80% de fijación del componente C3 se consigue si se incuba el microorganismo durante 1 hora en un medio con un 10% de suero (169) de forma que, en las mismas condiciones, S. aureus se opsoniza más rápidamente que E. coli. Sin embargo, esos mismos trabajos, muestran diferencias en la cantidad de C3b fijado por E. coli y S. aureus que puede condicionar la fagocitosis de ambos microorganismos.

2.1.2.2. Efecto del suero sobre E. coli y S. aureus pretratados.

El efecto bactericida del suero puede ser potenciado por una exposición concomitante de la bacteria al antibiótico, o por un pretratamiento previo con concentraciones menores o mayores que la CMI. Los antimicrobianos pueden alterar la envuelta de las bacterias de forma que se modifica su sensibilidad al suero humano. Hay tres localizaciones donde los cambios en la superficie celular pueden alterar los efectos del complemento (170). Estos son:

1. el sitio de unión al anticuerpo
2. el sitio de ataque del complejo de la fase de ensamblaje
3. el sitio de inserción de los componentes de la fase de ataque (complejo de ataque a la membrana o CAM).

Además la muerte por el suero puede ser afectada por sitios relevantes para la acción de la lisozima (171).

A este respecto se ha llegado a diferentes conclusiones en varios estudios, observándose incremento, descenso e incluso ningún efecto en la sensibilidad de las bacterias al suero. La diferente sensibilidad al suero después del tratamiento antimicrobiano encontrada, puede ser el resultado de alteraciones producidas en más de una localización en la superficie bacteriana, en este sentido hay evidencia de que el complemento ataca la membrana externa y la membrana citoplasmática de E. coli simultáneamente (172,173).

La polimixina B sensibiliza a Proteus mirabilis a la acción bactericida del suero y lo mismo provoca en E. coli el tratamiento con polimixina B (14) y ampicilina (8).

Se ha señalado que los antimicrobianos que producen filamentación en bacilos Gram-negativos a concentraciones subinhibitorias no tienen efectos sinérgicos con el

suero (65,169). Por el contrario, otros trabajos sostienen que concentraciones subinhibitorias de antibióticos, en particular, penicilinas y cefalosporinas, pueden ejercer un efecto profundo en la morfología de estos bacilos que hace incrementar su sensibilidad al suero (174,168). Loos et al. (175) y Betz e Isliker (176) mostraron que el primer componente del complemento, el C1, se fija a las bacterias Gram-negativas y que esta fijación dependía de la estructura de la membrana externa. Se ha demostrado que los betalactámicos podrían influir en la fijación de C1 en E. coli (176,177). E. coli expuesto a diferentes antibióticos betalactámicos puede unir, incluso 900 veces más C1 que las bacterias no tratadas (51).

Exposiciones de E. coli a concentraciones subinhibitorias de ampicilina, trimetoprim, estreptomina y tetraciclina (178), mecilinam (179) y rifampicina (180) tuvieron un efecto sinérgico con el suero en la muerte de la bacteria.

En el caso de tetraciclina, los resultados son contradictorios, se ha señalado un efecto antagónico entre tetraciclina y el efecto bactericida del suero humano normal sobre E. coli y por otra parte el efecto opuesto ha sido observado por otros autores (51).

La combinación de cloranfenicol y suero humano normal es antagonista en la muerte de E. coli y aditivo en la muerte de Salmonella typhi (51).

McDonald et al. (9) encuentran que E. coli crece mejor que el control en presencia de suero cuando sufre un pretratamiento con concentraciones por encima de las inhibitorias de ampicilina, amoxicilina y cefoxitina; no sucede lo mismo si el pretratamiento es con gentamicina o cloranfenicol (9,181).

En nuestro estudio, el pretratamiento con imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima no tuvo efecto sobre la sensibilidad de E. coli al suero.

Milatovic et al. (14) señalaron que los estafilococos preincubados con 1/3 de la CMI de clindamicina presentaron un consumo de complemento y una fijación de C3b más rápida sobre la superficie bacteriana que los estafilococos control.

En el caso de S. aureus, McDonald no encuentra alteraciones en el crecimiento por la presencia de un 10% de suero, si los microorganismos son tratados durante diez minutos con 10xCMI de penicilina G, eritromicina, amoxicilina y clindamicina (9).

El suero si tiene un efecto bactericida marcado sobre estreptococos que crecen a concentraciones subinhibitorias de penicilina (182).

Se ha determinado que el suero tiene un profundo efecto en el crecimiento de S. aureus en fase postantibiótica provocada por el pretratamiento con fluorquinolonas a concentraciones por encima de las inhibitorias, ya que permite un retraso en el crecimiento bacteriano más prolongado (183). Otros estudios señalan en presencia de suero una reducción del 80% del PAE cuando el antibiótico ensayado era cloxacilina (183) y un bloqueo del efecto postantibiótico de fosfomicina (184).

En este trabajo la presencia de suero en el medio de incubación de S. aureus, actuó de forma antagónica con el efecto del pretratamiento antimicrobiano, y el crecimiento con suero fue mayor que el de las bacterias pretratadas e incubadas en ausencia de suero. En el caso del pretratamiento de S. aureus con cefepime y cefpodoxima, la presencia de suero anula el retraso en el crecimiento bacteriano que se manifiesta en ausencia de suero.

2.1.3. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs.

2.1.3.1. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs frente a E. coli y S. aureus control.

En ausencia de factores séricos, los leucocitos PMNs manifestaron su actividad bactericida frente a E. coli durante las dos primeras horas del experimento. La actividad de los leucocitos fue más patente cuando en el medio de incubación había sido añadido suero. En ausencia de suero el máximo porcentaje de muerte fagocítica fue del 39.75% en la primera hora de incubación, por el contrario, en presencia de suero se obtuvo un porcentaje máximo de muerte fagocítica del 71.81% al término del ensayo. La opsonización con suero se considera generalmente como un requisito para una óptima fagocitosis y muerte de la bacteria por leucocitos PMNs.

Las células fagocíticas poseen receptores para las opsoninas estables al calor (receptores Fc) y receptores con especificidad para la forma activada del tercer componente del sistema de complemento, C3b (185). La adhesión de las bacterias a los receptores en los fagocitos permite inmovilizar al microorganismo y contribuye a su fagocitosis.

La fagocitosis de E. coli incubado con suero fue creciendo a lo largo del tiempo. A medida que transcurre el tiempo, mayor será la opsonización de los microorganismos y debido a ello la sensibilidad a la actividad bactericida del leucocito se ve aumentada. Existen trabajos que sugieren que el suero favorece la fagocitosis porque aumenta la superficie hidrofóbica de las bacterias (186).

En el caso de S. aureus la presencia de suero resulta determinante ya que si no hay suero en el medio no se produce ninguna actividad bactericida. Los estafilococos pueden sobrevivir después de haber sido fagocitados por los leucocitos, esta supervivencia parece estar correlacionada con su virulencia (187). La presencia de leucocitos en ausencia de suero provoca una disgregación de los *clusters* (188), solo aquellas células situadas en las zonas más externas del *cluster* se ven atacadas por los enzimas lisosomales y las que están en el centro quedan protegidas de manera que, al lisis los leucocitos con agua a pH básico, estas células disgregadas no afectadas quedan libres y originan colonias por lo que se produce un aumento en el número de UFC.

La fagocitosis y muerte intracelular, en presencia de suero de E. coli fue mayor que la de S. aureus.

Después de la incubación durante una hora en un medio con un 10% de suero, el porcentaje de C3b del componente C3 que se fija a la membrana de E. coli es del 33% frente a un 17% de S. aureus (189). La heterogenicidad de requerimientos opsónicos encontrados en tres especies bacterianas (S.aureus Cowan I, L.monocytogenes y E. coli ON2) probablemente está relacionado con diferencias en la "estructura opsónica" de las paredes celulares de esas especies (185). En otros estudios, las diferencias en la activación del complemento (190) y en los requerimientos opsónicos (41) han sido también encontrados entre cepas de la misma especie, estos hallazgos están correlacionados con diferencias en los componentes de la pared de las cepas.

2.1.3.2. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs frente a E. coli y S. aureus pretratados.

En este trabajo analizamos el efecto de imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima, sobre la sensibilidad a la muerte fagocítica de E. coli y S. aureus, en

presencia y ausencia de suero.

El máximo efecto PALE de todas las combinaciones antimicrobiano-microorganismo, requirió la participación de las opsoninas del suero (61). La fagocitosis es un proceso determinado por la cantidad de opsoninas disponibles (concentración sérica) y por el tiempo durante el que están presentes dichas opsoninas (tiempo de opsonización). En el suero normal la opsonización está mediada principalmente por complemento y solamente aumentado por anticuerpos. Cuando un *pool* de suero humano normal, que contiene anticuerpos y complemento como opsoninas es empleado como fuente opsónica, no podemos distinguir entre la opsonización mediada por la vía clásica o alternativa de complemento, y por los anticuerpos. Para estudiar el efecto de los antibióticos en la fagocitosis dependiente de anticuerpos o dependiente de complemento, las bacterias deben ser opsonizadas en suero calentado (con anticuerpos como única fuente opsónica) y en suero de pacientes con agammaglobulinemia (con sistema de complemento intacto) (191).

En este trabajo empleamos como fuente de opsoninas suero humano normal y como ha sido señalado anteriormente, el efecto PALE fue mayor, no ha sido un objetivo de este trabajo estudiar el mecanismo de opsonofagocitosis de bacterias tratadas y bacterias control, para profundizar en este aspecto se deberán realizar ensayos, con distintas clases de sueros.

Las opsoninas presentes en el suero favorecen la fagocitosis de bacterias por leucocitos PMNs. El pretratamiento de *E. coli* y *S. aureus* con los cuatro betalactámicos ejerció un efecto sinérgico con el suero, en la opsonofagocitosis. Es decir, el aumento en la fagocitosis debido al suero, es mayor cuando la superficie celular bacteriana ha sido dañada por los antibióticos. El efecto sinérgico del suero y el pretratamiento fue observado con todas las combinaciones antimicrobiano-microorganismo exceptuando aquellas que no presentaron efecto PALE, es decir: *E. coli*-cefpodoxima y *S. aureus*-cefepime. La exposición de las bacterias durante un breve período de tiempo a los antimicrobianos puede provocar cambios en las estructuras de unión a anticuerpos o en los sitios de unión a anticuerpos o en los sitios de activación de complemento que favorecen la opsonofagocitosis.

La inhibición de la muerte fagocítica de bacterias pretratadas con cloranfenicol (19) y aztreonam (48), por azul tripano que bloquea los receptores C3 de los PMNs humanos, señala que el aumento de la muerte fagocítica depende de una adecuada opsonización de la bacteria. Lo mismo ha sido comprobado con concentraciones subinhibitorias de otros antibióticos como penicilinas (9) y cefalosporinas (21). Otros autores han demostrado el efecto del suero en el aumento de la fagocitosis de E. coli resistente al suero, tratada con ceftriaxona (2). El pretratamiento de E. coli capsulado, con concentraciones sub-CMIs de mecilinam y ceftriaxona, incrementó la capacidad opsonica del suero normal y proporcionó una mejor fagocitosis de estas cepas por PMNs humanos (192). Los mismos estudios señalaron, sin embargo, que la exposición a cefepime no condujo a un incremento en la reacción de anticuerpos contra antígenos de la pared celular. Es posible que la unión de opsoninas a epítomos de la bacteria tratada con cefepime no difiera de las uniones de opsoninas del suero a las bacterias no tratadas, Veringa et al. demostraron que la muerte fagocítica de S. aureus tratado con clindamicina fue mayor que la de las bacterias controles, debido a un incremento en la sensibilidad de las bacterias tratadas con clindamicina a la fagocitosis dependiente de anticuerpo y complemento (191). Milatovic et al. (14) señalaron que los estafilococos tratados con 1/3 de la CMI de clindamicina, fueron opsonizados más rápidamente que las bacterias no tratadas y que la concentración de suero requerida para una suficiente opsonización, fue menor para las bacterias tratadas con clindamicina. Eritromicina y miocamicina influyeron indirectamente sobre la fagocitosis de S. aureus por los leucocitos PMNs, la actividad fagocítica aumentó debido a un cambio en los requerimientos opsonicos de la bacteria (193).

Los dos carbapenemes, imipenem y meropenem provocaron un efecto PALE en los dos microorganismos. La magnitud del efecto fue muy similar, en presencia de suero, el porcentaje medio de muerte fagocítica (durante las tres horas del experimento) de E. coli pretratado con imipenem y meropenem, es del 78.95% y 75.95% respectivamente. En el caso de S. aureus, los porcentajes son 61.78% y 64.20% para imipenem y meropenem.

Cefepime no incrementó la sensibilidad de E. coli a la muerte fagocítica por

leucocitos PMNs, en ausencia de factores séricos, sin embargo, en presencia de suero, el efecto PALE fue muy similar al producido por los carbapenemes, el porcentaje medio de muerte fagocítica fue del 78.06%. Por el contrario, cefepime no indujo un efecto inmunomodulador frente a S. aureus. Otros autores, han obtenido con cefotaxima (189) y con cefdinir (194), los mismos resultados, es decir un efecto PALE positivo frente a E. coli y ningún efecto frente a S. aureus.

Cefpodoxima no indujo efecto PALE frente a E. coli, ni siquiera en presencia de opsoninas. Sin embargo, el efecto PALE que produjo frente a S. aureus fue similar al de los carbapenemes, alcanzando un porcentaje medio de muerte fagocítica del 60.83%.

McDonald et al (194) considera que el PALE positivo que se puede encontrar con algunos betalactámicos frente a las bacterias Gram-negativas, se debe a modificaciones superficiales que alteran la fijación del complemento y por tanto el PALE debido a betalactámicos, frente a E. coli sería causado por un incremento en la captura bacteriana. Cefpodoxima no produjo efecto PALE ni siquiera en presencia de opsoninas, pero la explicación anterior podría ser válida para el PALE que presenta cefepime, puesto que en ausencia de suero no hay un incremento en la muerte fagocítica de las bacterias tratadas, sin embargo con suero, las bacterias tratadas son más sensibles a la muerte fagocítica por leucocitos PMNs.

Imipenem y meropenem no precisaron factores séricos para producir un efecto PALE frente a E. coli, la exposición durante un breve período de tiempo a concentraciones suprainhítorias de los antibióticos hicieron más sensible a la bacteria a la muerte fagocítica por PMNs, en la fase postantibiótica. Los mecanismos de reparación de E. coli, restauraron rápidamente los daños producidos por la exposición al antibiótico para evitar la muerte celular, pero en presencia de PMNs o de PMNs y suero, la combinación de los daños de la membrana y la fagocitosis, temporalmente supera la resistencia bacteriana (61).

Aunque el mecanismo exacto a través del cual se produce un aumento de la sensibilidad es desconocido, probablemente se relaciona con alteraciones debidas a la exposición al antibiótico, en la pared celular que protege contra la fagocitosis por los

PMNs (9). Las envueltas celulares dañadas por el antibiótico pueden facilitar el acceso de los factores letales de los PMNs a sus dianas en las bacterias o permitir la salida al medio extracelular de sustancias activas quimiotácticamente (21). El incremento en la sensibilidad a la actividad de los leucocitos, de E. coli tratado con los dos carbapenemes, imipenem y meropenem, podría estar relacionado con las alteraciones estructurales en la bacteria, producidas por el antibiótico y suficientes para provocar cambios en la sensibilidad a la muerte fagocítica en ausencia de suero y por las modificaciones en las estructuras de unión a anticuerpos o en los sitios de activación de complemento.

La eficacia de los antibióticos para producir alteraciones que conlleven un cambio en la sensibilidad a los fagocitos varía incluso dentro de la misma familia, como muestran los resultados de este estudio y los de un trabajo de McDonald et al. (19) en el que fueron empleados aislados clínicos de S. aureus, E. coli y Bacteroides fragilis y se examinaron los efectos del pretratamiento antibiótico en la sensibilidad a la actividad de leucocitos y suero. Los antibióticos betalactámicos empleados en este estudio (penicilina G, amoxicilina, ampicilina y cefoxitina) sensibilizaron la bacteria a la actividad bactericida de los leucocitos y el grado de sensibilización fue variable entre los distintos antibióticos y cepas. Se ha señalado que estas diferencias se deben probablemente a diferencias en el mecanismo de actuación de los antimicrobianos y a su efecto en la estructura de la pared celular.

Los cambios producidos por los antibióticos con concentraciones CMI o mayores son diferentes de aquellas producidas por antibióticos a concentraciones sub-CMI (16). Las distintas alteraciones en la morfología bacteriana producidas por concentraciones subinhibitorias de betalactámicos se deben a diferencias en el modo de acción entre los betalactámicos (195). Cada antibiótico betalactámico tiene una afinidad de unión específica para cada PBP. Los cambios morfológicos están relacionados con la afinidad de unión del antibiótico a las PBPs. La inhibición de PBP3 conduce a la formación de filamentos y la inhibición de PBP2 da lugar a formas esféricas en E. coli. Imipenem y meropenem inducen formas redondeadas (79,102). Meropenem en E. coli inhibe PBP2, imipenem a PBP2 y PBP1. Cefepime y cefpodoxima inducen filamentos en

E.coli. La principal diana en E. coli de cefepime es PBP3, aunque también se une a PBP2 (196). Cefpodoxima interacciona sobretodo con PBP3 (197).

Las alteraciones morfológicas producidas por betalactámicos han sido relacionadas con distintos efectos en la fagocitosis y muerte intracelular (47). La exposición de los microorganismos a concentraciones suprainhítorias de betalactámicos, con diferente afinidad de unión a las PBPs, resultó en un aumento de la sensibilidad a la actividad bactericida de los PMNs con diverso grado de intensidad.

Los carbapenemes presentan efecto postantibiótico (PAE) contra, no solo bacterias Gram-positivas, sino también Gram-negativas (62,198,199), esta excepción dentro de la familia de los betalactámicos, ha sido relacionado con las diferencias morfológicas observadas en los organismos Gram-negativos, las clásicas penicilinas y cefalosporinas inducen largos filamentos. Se ha señalado que con la restauración de solo un pequeño porcentaje de PBP3, el filamento que contiene varios genomas se puede dividir, mientras que las formas redondeadas producidas por los carbapenemes deben sufrir una fisión binaria, más compleja, para convertirse en células individuales (200). Si los distintos cambios morfológicos provocados por la exposición a los antibióticos dan lugar a diferencias en las cinéticas de crecimiento, también esas diferencias estructurales pueden originar una variedad de respuestas en la sensibilidad hacia la actividad de los PMNs.

Tuslane (201) fue el primero en describir alteraciones en los cocos expuestos a penicilina. Hay poca variación en la afinidad de la mayoría de los betalactámicos a las PBPs de los estafilococos y por tanto los efectos morfológicos son similares. Después de exposiciones cortas a concentraciones superiores a la CMI de betalactámicos, los septos que separan unas células de otras son menos densos y de contornos irregulares, además de presentar una pared periférica más delgada (158). Se considera que los betalactámicos frente a S. aureus provocan un daño en la bacteria que la hace más sensible a los mecanismos internos de muerte intracelular (9,202).

Otros autores han realizado estudios sobre el efecto PALE con distintos antimicrobianos y microorganismos, y el efecto PALE ha sido demostrado no solo con antibióticos cuyo principal sitio de acción es la pared celular bacteriana, sino también

y con diferente grado, con antibióticos de otras familias como es el caso de cloranfenicol (19), macrólidos, aminoglicósidos (9) y quinolonas (181). Desafortunadamente no se ha seguido una metodología estandarizada. En el siguiente cuadro se exponen los resultados obtenidos por otros autores.

MICROORGANISMOS	ANTIMICROBIANOS	PALE
<u>E. coli</u>	Cefdinir ^{a,♦♦} Cefoxitina ^{a,*} Amoxicilina ^{a,**} Cloranfenicol ^{a,-} Gentamicina ^{a,*} Ampicilina ^{a,*} Lomefloxacino ^{b,♦} Ciprofloxacino ^{b,♦} Norfloxacino ^{b,♦}	+ + + + + + + + +
<u>S. aureus</u>	Cefdinir ^{a,♦♦} Penicilina G ^{b,*} Amoxicilina ^{b,*} Clindamicina ^{b,*} Eritromicina ^{b,*}	- + + + +
<u>P. aeruginosa</u>	Cefotaxima ^{a,**} Aztreonam ^{a,**} Gentamicina ^{a,**} Lomefloxacino ^{c,♦} Ciprofloxacino ^{c,♦} Norfloxacino ^{c,♦}	- - - + + +
<u>K. pneumoniae</u>	Aztreonam ^{d,**}	+
<u>S. marcescens</u>	Cefotaxima ^{d,**} Aztreonam ^{d,**}	- +

pretratamiento: a=4xCMI,10 min; b=10xCMI,10 min; c=CMI,10 min; d=4xCMI,30 min; referencias:
* (9), ** (48), ♦ (181), ♦♦ (194), - (61).

Revisión de P. Pérez (1994) (189).

2.2. Efecto de la presencia continua de antimicrobianos sobre la actividad bactericida de los leucocitos PMNs.

2.2.1. Cinéticas de letalidad en E. coli y S. aureus.

Las cinéticas de letalidad de E. coli y S. aureus se estudiaron durante tres horas y las bacterias fueron incubadas en HBSS-gelatina suplementado con un 20% de suero humano normal, para servir como control de las curvas de crecimiento en presencia de antimicrobianos, suero y leucocitos PMNs.

Shah et al.(203) propusieron tres patrones de actividad bactericida para los antibióticos betalactámicos. El primero es típico de penicilinas y se caracteriza por un aumento inicial en la tasa de muerte al ir incrementando las concentraciones, pero solo hasta concentraciones de 4-5 veces la CMI. Concentraciones mayores no aumentan de forma significativa la actividad bactericida. El segundo tipo, propio de cefalosporinas se caracteriza por un incremento lineal en la actividad bactericida, en un rango mayor de concentraciones. Sin embargo, otros investigadores sostienen que la muerte bacteriana por cefalosporinas es relativamente independiente de la concentración y por tanto es muy similar al patrón observado con penicilinas (151,62,153,204,205). El último tipo de actividad, está caracterizado por un descenso en la tasa de muerte a altas concentraciones. Este tipo frecuentemente llamado "efecto Eagle" o efecto paradójico, fue descrito por Kirby en 1945 (206). Ha sido observado con betalactámicos y determinadas cepas de estafilococos y estreptococos (207).

2.2.1.1. Cinéticas de letalidad de E. coli.

La actividad bactericida de imipenem contra E. coli dependió de la concentración de antimicrobiano, con 1/2xCMI la diferencia en ufc con los organismos control a las tres horas fue aproximadamente 1.5 log₁₀, en el caso de 4xCMI fue de 3.5 log₁₀. La actividad de meropenem fue ligeramente menor que la de imipenem y también dependió de la concentración, la diferencia en el número de viables después de tres horas de incubación con 1/2xCMI fue de 1.2 log₁₀, con 4xCMI fue de 3 log₁₀.

La actividad de cefepime y cefpodoxima contra E. coli, varia con la concentración de antibiótico. Los dos antimicrobianos presentan una actividad muy similar, con 1/2xCMI, se produce una diferencia de ufc algo mayor que con los

carbapenemes, 1.7 y 1.6 respectivamente, mientras que con 4xCMI la actividad comparada con imipenem y meropenem es menor, la diferencia con las bacterias control es de $2.7 \log_{10}$ en ambos casos.

2.2.1.2. Cinéticas de letalidad de S. aureus.

La actividad bactericida de los cuatro betalactámicos resultó ser muy similar. La actividad contra S. aureus estuvo relacionada con la concentración de antimicrobiano. Cuando la concentración de antibiótico fue de $1/2$ xCMI la diferencia, en ufc con las bacterias control, a las tres horas, fue aproximadamente $0.7 \log_{10}$ en el caso de los carbapenemes y $0.6 \log_{10}$ en el caso de las cefalosporinas. La actividad bactericida fue mayor con 4xCMI, imipenem causó una diferencia de $3.5 \log_{10}$ y meropenem de $3.6 \log_{10}$, las cefalosporinas presentaron una actividad similar aunque ligeramente menor, aproximadamente $3.5 \log_{10}$.

2.2.2. Actividad bactericida de los leucocitos PMNs frente a E. coli y S. aureus en presencia de antimicrobianos.

El principal problema que encontramos en el estudio de la determinación de la muerte bacteriana en presencia de PMNs y antimicrobianos, es el conocimiento de los mecanismos involucrados en los cambios de sensibilidad, de las bacterias incubadas con los antimicrobianos frente a los leucocitos, cuando ocurren dichos cambios. Los diferentes elementos presentes en el sistema estudiado: microorganismo, PMNs y antimicrobiano, interactúan entre sí, de manera que los resultados observados pueden ser debidos a un conjunto de efectos directos del antimicrobiano sobre las funciones de la célula fagocítica y de efectos indirectos sobre la bacteria capaces de alterar la sensibilidad de los microorganismos a la muerte fagocítica. Además, en esta clase de sistemas *in vitro*, deben ser tenidos en consideración aspectos como la penetración y la actividad de los antibióticos en el interior del polimorfo.

El conocimiento del mecanismo exacto a través del cual se produce una modificación de la sensibilidad a la actividad leucocitaria, requiere ensayos diseñados de tal forma que diferencien claramente los distintos efectos, es decir:

- el causado por el antimicrobiano sobre el microorganismo y sobre la célula fagocítica

- el causado por el fagocito sobre el microorganismo y sobre el antibiótico (inactivación en determinados compartimientos intracelulares) y
- el causado por el microorganismo sobre el antibiótico (sensibilidad/resistencia y/o multiplicación intracelular).

Para evaluar cada uno de los efectos que pueden estar implicados en la sensibilización a la actividad fagocítica, los estudios deben realizarse considerando aisladamente cada uno de los elementos que pueden intervenir, con los controles necesarios y anulando las restantes variables por ejemplo con inhibidores que bloqueen determinadas actividades (distintas clases de suero, tripano azul, fenilbutazona, citocalasina B, etc.).

Nuestro propósito en este trabajo, consistió en cuantificar y valorar la magnitud de los posibles cambios en la sensibilidad a la actividad leucocitaria, debido a ello, mantuvimos intactas las funciones celulares, sin añadir inhibidores que permitan diferenciar los mecanismos implicados, y empleamos suero humano normal como fuente de opsoninas, para obtener una mayor aproximación a la interacción factores de defensa del hospedador-antimicrobiano.

Pruul et al. (60) clasificaron diversos antibióticos de acuerdo con su interacción con los polimorfos, en los siguientes grupos:

1. aquellos que incrementan la muerte fagocítica con una exposición previa pero con poco o ningún efecto en combinación con polimorfos, los efectos incluidos en este grupo incluyen penicilina y cloranfenicol,
2. aquellos que son más efectivos con una exposición continua, aquí pueden incluirse carbenicilina, ampicilina y enoxacino,
3. aquellos que incrementan la muerte fagocítica en ambas condiciones, por ejemplo eritromicina,
4. aquellos antibióticos que parecen ser relativamente ineficaces para incrementar la muerte fagocítica bajo las condiciones ensayadas, por ejemplo gentamicina a bajas concentraciones y posiblemente tetraciclinas.

La exposición de E. coli a imipenem y meropenem potenció la actividad bactericida de los leucocitos PMNs, hallamos un efecto sinérgico tanto a

concentraciones subinhibitorias ($1/2 \times \text{CMI}$) como con concentraciones suprainhibitorias ($4 \times \text{CMI}$).

En muchos estudios que emplean concentraciones subinhibitorias e inhibitorias, se ha observado que el efecto estimulador de los antibióticos se hallaba presente a concentraciones subinhibitorias y este efecto no fue incrementado con concentraciones inhibitorias, muchos antibióticos mejoran la actividad bactericida a partir de concentraciones subinhibitorias (208). Diferentes resultados fueron hallados por Pruul et al., la actividad bactericida óptima de los PMNs frente a E. coli sucedía con concentraciones suprainhibitorias de cefdinir, sin embargo, con $1/2 \times \text{CMI}$ las actividades de los leucocitos PMNs y de cefdinir fueron aditivas (194).

Nuestros resultados coincidieron con los resultados de Pruul et al., en el sentido de obtener un efecto sinérgico óptimo con concentraciones inhibitorias, aunque también coinciden con los resultados de otros autores que señalan que el efecto sinérgico que pueden presentar los antimicrobianos con los PMNs, ya se halla a concentraciones subinhibitorias.

La presencia de cefepime y cefpodoxima no favoreció la actividad de los leucocitos, con ninguna de las dos concentraciones ensayadas. Las actividades de PMNs y antimicrobianos fueron aditivas.

Los diferentes resultados hallados con estos cuatro antimicrobianos frente a E. coli pueden tener relación con las diferentes alteraciones morfológicas que ocasionan en los bacilos Gram-negativos y que están dirigidas por su relativa afinidad de unión a las PBP. Los dos carbapenemes inducen en los bacilos Gram-negativos formas redondeadas, a diferencia de las cefalosporinas, que inducen filamentos, y ambos presentan un efecto sinérgico con los leucocitos que es mayor a concentraciones suprainhibitorias. Las alteraciones morfológicas debidas a la exposición a imipenem y meropenem podrían ocasionar en E. coli una mayor sensibilidad a la actividad de los leucocitos.

Los estudios sobre penetración y actividad intracelular de antimicrobianos, señalan que imipenem puede acumularse y tener actividad en el interior de los PMNs y macrófagos (209,210). Otros autores en un estudio sobre el efecto de meropenem e

imipenem en la muerte intracelular de S. aureus observaron que a concentraciones relativamente altas de meropenem (8xCMB) se producía un descenso significativo en el número de viables intracelulares de neutrófilos humanos después de seis horas de incubación. Imipenem, sin embargo, no mostró ningún efecto sobre la viabilidad de las bacterias intracelulares (211).

Por otra parte, Gnarpe et al. han señalado un efecto estimulador directo de imipenem sobre los PMNs (212). El pretratamiento de E. coli con concentraciones subinhibitorias de imipenem en un trabajo de Adinolfi y Bonventre (47) demostró el incremento de las defensas humorales y celulares contra E. coli. Las formas redondeadas de E. coli causadas por la exposición al antibiótico fueron más rápidamente fagocitadas y matadas. Las alteraciones producidas en la superficie celular de la bacteria, incrementó también la actividad bactericida de anticuerpos y complemento. Otros estudios señalan que el pretratamiento de E. coli con imipenem incrementó la muerte de las bacterias independientemente de la ingestión por los fagocitos (213).

Las dos cefalosporinas, cefepime y cefpodoxima, no potencian la actividad del leucocito con ninguna de las dos concentraciones (1/2 y 4xCMI). Las cefalosporinas penetran poco en los fagocitos (214) y su actividad intracelular es baja (24). Aunque cefamandol presenta actividad intracelular frente a E. coli (215).

Muchos efectos de sinergismo entre antibióticos y células fagocíticas se deben a cambios que tienen lugar en la superficie bacteriana debidos a la exposición al antibiótico, esos cambios pueden implicar al complemento y a los anticuerpos específicos, además las nuevas cefalosporinas pueden tener efectos positivos en la ingestión y muerte fagocítica (dependiente e independiente de oxígeno) (29).

Las formas filamentosas de K. pneumoniae después de la exposición a concentraciones sub-CMI de ceftriaxona fueron mejor fagocitadas y más sensibles a los mecanismos independientes de oxígeno (53).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Conejo et al. en un estudio sobre el efecto de cefepime en la adherencia y fagocitosis de P. aeruginosa, las concentraciones terapéuticas de cefepime no influyeron en los mecanismos bactericidas de los PMNs. En otro estudio de Raponi, la preexposición de bacterias Gram-negativas

a sub-CMIs de cefepime no incrementó su fagocitosis por los PMNs.

Imipenem y meropenem incrementan la muerte fagocítica de E. coli en las dos situaciones ensayadas en este estudio, es decir, con una exposición previa, y con una exposición continua de antimicrobiano.

Cefepime incrementa la muerte fagocítica de E. coli si la bacteria es pretratada pero no favorece la actividad del leucocito en combinación con estos.

Cefpodoxima no incrementa la actividad de los leucocitos frente a E. coli ni mediante pretratamiento antibiótico ni a través de una exposición continua al mismo.

Los resultados de la exposición de S. aureus a leucocitos PMNs y antimicrobianos son, en general, muy homogéneos. Los efectos bactericidas de los leucocitos y de las dos cefalosporinas, actúan de forma sinérgica cuando la concentración es subinhibitoria, imipenem actúa también de forma sinérgica con los PMNs, aunque en menor grado, sin embargo, meropenem presenta efecto aditivo con los PMNs.

Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden debilitar la integridad de las membranas bacterianas. Esto puede facilitar el acceso de los factores del fagocito a sus dianas en las bacterias dañadas (218). El pretratamiento de S. aureus con imipenem aumenta su sensibilidad a los macrófagos peritoneales murinos empleados en un estudio (47), debido a alteraciones superficiales en la bacteria. La incubación simultánea de macrófagos y estafilococos con concentraciones suprainhibitorias y subinhibitorias de imipenem, también incrementó la actividad fagocítica y la muerte intracelular, posiblemente debido a alteraciones producidas en la bacteria (216).

El pretratamiento de S. aureus con concentraciones subinhibitorias de cefpodoxima (1/4 y 1/2xCMI), aumenta de forma significativa la actividad fagocítica de los leucocitos PMNs, este incremento no se relacionó con la producción de radicales superóxido, por otra parte a concentraciones terapéuticas no mostró un efecto directo sobre los mecanismos fagocíticos y bactericidas de los leucocitos PMNs (217). El pretratamiento de S. aureus con concentraciones subinhibitorias de cefpodoxima y cefepime aumentó su fagocitosis (216,217).

En los experimentos con concentraciones suprainhibitorias (4xCMI), la muerte

hallada con una exposición continua a los cuatro antibióticos fue menor que la debida a la suma del efecto del antibiótico y la actividad de los leucocitos cuando actúan aisladamente. La muerte bacteriana en presencia de PMNs y 4xCMI de los antibióticos es menor que la debida al antibiótico exclusivamente. Los antibióticos betalactámicos son bactericidas en un medio nutritivo, pero si se hallan presentes PMNs, los organismos intracelulares estarán protegidos contra estos antibióticos.

S. aureus puede sobrevivir y multiplicarse en el interior de los fagocitos (18) y provocar infecciones crónicas, incluso sobreviven en el interior de los leucocitos cuando son incubados con altas concentraciones de varios antibióticos, incluyendo penicilinas y aminoglicósidos (6,219).

Puesto que la mayoría de los betalactámicos ni penetran en las células fagocíticas, ni afectan directamente a los leucocitos PMNs (1), la actividad extracelular de los antibióticos (4xCMI) es muy potente y S. aureus puede sobrevivir y multiplicarse en el interior de los PMNs, encontramos una tasa menor de muerte bacteriana cuando S. aureus es incubado con PMNs.

Imipenem y cefpdoxima incrementan la muerte fagocítica con una exposición previa de la bacteria y con una exposición continua de 1/2xCMI. La exposición de 4xCMI junto con PMNs no favorece la muerte fagocítica.

Meropenem favorece la actividad leucocitaria después de una exposición de la bacteria a concentraciones suprainhibitorias, pero no con una exposición continua junto con los leucocitos.

Cefepime no ejerce ningún efecto sobre la actividad de los leucocitos después de la exposición de las bacterias al antibiótico, ni en un medio con PMNs y concentraciones suprainhibitorias de antibiótico, si aumenta la actividad leucocitaria con una exposición continua a concentraciones subinhibitorias.

En síntesis, los resultados que hemos obtenido dependieron del microorganismo, antibiótico y concentración ensayada. Algunos antibióticos parecen producir un efecto favorecedor de la fagocitosis. El mecanismo exacto a través del cual ocurre este fenómeno es desconocido aunque las alteraciones estructurales en la superficie bacteriana han sido propuestas mayoritariamente como responsables del aumento en la

sensibilidad de la bacteria a la acción de los polimorfos.

3. APLICACIÓN CLÍNICA DE LOS ESTUDIOS SOBRE LA MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEUCOCITARIA EN FASE POSTANTIBIÓTICA Y EN PRESENCIA DE ANTIMICROBIANO.

Los factores intrínsecos a la interacción de los agentes antimicrobianos con los microorganismos son muy numerosos y determinan la eficacia terapéutica de estos agentes. Sin embargo, se hace más evidente que los test estándar de sensibilidad *in vitro*, que no prestan atención a los mecanismos de defensa del organismo invadido, no describen todo el potencial de un antimicrobiano en un paciente infectado.

El incremento de la fagocitosis y muerte intracelular, son actividades inmunomodulatorias deseables para los antibióticos que son administrados en infecciones bacterianas y fúngicas. Además, el aumento en el interés de la investigación sobre la interacción antimicrobiano-sistema inmune, se debe al incremento en el número de individuos comprometidos en los cuales, incluso una mínima influencia en la respuesta inmunológica, puede tener un efecto significativo en la recuperación.

Si determinados antibióticos pueden favorecer los mecanismos de defensa en determinadas poblaciones de pacientes, tales como los que tienen un sistema inmunológico comprometido, una terapia antimicrobiana más efectiva podrá ser proporcionada a estos individuos. Así por ejemplo, se ha comprobado que las nuevas cefalosporinas poseen propiedades inmunomodulatorias que estimulan la sensibilidad a la actividad antibacteriana del sistema inmunológico (194).

Los efectos potenciadores de los antimicrobianos pueden englobarse dentro de tres categorías (2):

1. mediante alteración de la estructura o integridad de la pared celular bacteriana, la opsonización es mejorada o la célula es más susceptible a los radicales de oxígeno y enzimas líticos de los PMNs

2. causando filamentos u otras alteraciones morfológicas, que mejoran la eficiencia de la fagocitosis, o haciendo más lento el crecimiento

3. por acumulación dentro de los fagolisosomas en forma bioactiva y ejerciendo efectos antibacterianos intracelularmente.

La tendencia normal en la terapia antimicrobiana, es reducir las dosis y el tiempo de administración del antibiótico (220). Craig y Ebert (198) sostienen que el objetivo de la dosificación de antibióticos betalactámicos, debe ser maximizar el tiempo de exposición a concentraciones superiores a la CMI. Hanberger y Nilsson (221), señalan que las CMIs de los nuevos betalactámicos, para muchas especies, son muy bajas y dosis intermitentes pueden proporcionar concentraciones supra-CMIs durante largo tiempo.

Los carbapenemes poseen un efecto PAE contra no solo organismos Gram-positivos, sino también Gram-negativos (198,62,199). Esto hace que la "regla" de mantener la concentración del antimicrobiano por encima de la CMI durante todo el intervalo entre dosis no sea válido para carbapenemes (222). Los ensayos clínicos en humanos utilizando nuevos betalactámicos, son realizados generalmente con dosis intermitentes, se ha observado que una alta concentración de imipenem durante un tiempo breve es más eficaz que un largo contacto del antibiótico y el microorganismo con una concentración activa del antibiótico. En un modelo animal (223) se encontró que el tiempo en que los niveles en suero debían exceder la CMI, para producir un efecto bacteriostático *in vivo* contra bacilos Gram-negativos, era menor para carbapenemes que para penicilinas o cefalosporinas. En el caso de pacientes inmunocomprometidos, se ha sugerido que las concentraciones en suero de betalactámicos que exceden continuamente la CMI de un determinado patógeno puede mejorar el resultado terapéutico (222). Esto se puede conseguir con una administración continua o intermitente de betalactámicos con largas vidas medias (130).

El tratamiento de infecciones sépticas en pacientes neutropénicos provocadas por patógenos para los cuales las CMIs son altas, es la situación más crítica respecto a la dosificación (221). En situaciones críticas donde fallan los factores de defensa del organismo, como ocurre en enfermos inmunodeprimidos, una exposición breve a concentraciones inhibitorias puede no ser eficaz. Sin embargo, en presencia de los factores del hospedador, la supresión del crecimiento de la bacteria puede ocurrir incluso en ausencia del antibiótico. El efecto postantibiótico según Eagle et al. (56) puede contribuir a la eficacia de terapias de dosificación intermitente, pero estos

autores, afirman que los factores del hospedador son cruciales para determinar pautas de dosificación seguras.

En el caso de combinaciones de antibiótico-microorganismo en las que se presenta el fenómeno PALE, podrían modificarse las pautas de dosificación, rebajando la concentración de antimicrobiano y prolongando más el tiempo entre dosis.

Es difícil extraer conclusiones sobre un grupo entero de antibióticos, basado en los datos obtenidos con un pequeño número de antimicrobianos. Para obtener un cuadro real de la interacción antibiótico-sistema inmune y conocerlos principales efectos adversos y positivos, cada antimicrobiano debe ser examinado, de esta forma sería posible desarrollar regímenes de terapia antibacteriana más eficaces. Por otra parte el diseño cuidadoso de experimentos en humanos y animales contribuiría al conocimiento de las complejas relaciones entre el microorganismo, antimicrobiano y sistema inmune.

CONCLUSIONES

Del análisis de nuestros resultados podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La exposición de E. coli durante 10 minutos, con cuatro veces la CMI de imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima, no modificó su cinética de crecimiento.

2. La exposición de S. aureus durante 10 minutos con cuatro veces la CMI de imipenem, meropenem, cefepime y cefpodoxima, provocó un retraso en el crecimiento bacteriano, más acusado con los carbapenemes.

3. El pretratamiento de E. coli con los antimicrobianos utilizados, no induce un cambio en la sensibilidad al suero humano normal de esta cepa que sigue siendo resistente después del tratamiento antimicrobiano.

4. El suero no alteró la cinética de crecimiento de S. aureus no expuesto a los antimicrobianos, pero si modificó el crecimiento de S. aureus pretratado con los cuatro antibióticos, de forma que se redujo el retraso en el crecimiento bacteriano debido al pretratamiento.

5. Imipenem, meropenem y cefepime provocan un aumento en la sensibilidad a la muerte fagocítica de E. coli, es decir inducen efecto PALE. Los dos carbapenemes presentaron un efecto PALE mayor que el observado con cefepime.

6. Imipenem, meropenem y cefpodoxima provocan un aumento en la sensibilidad a la muerte fagocítica de S. aureus, la magnitud del efecto PALE fue similar.

7. El máximo efecto PALE requiere la participación de las opsoninas del suero.

8. El resultado en la actividad bactericida de una exposición continua de E. coli a concentraciones subinhibitorias y suprainhibitorias de carbapenemes junto con leucocitos PMNs fue sinérgico.

9. El resultado en la actividad bactericida de una exposición continua de E. coli a concentraciones subinhibitorias y suprainhibitorias de cefalosporinas junto con leucocitos PMNs fue aditivo.

10. La actividad bactericida de leucocitos PMNs y concentraciones subinhibitorias de los antibióticos frente a S. aureus, fue sinérgica, excepto con meropenem que fue aditiva.

11. La actividad bactericida conjunta de leucocitos PMNs y concentraciones

suprainhedorias de los cuatro antimicrobianos frente a S. aureus fue menor que la suma de ambas actividades de forma independiente.

12. El cambio en la sensibilidad a la muerte fagocítica por leucocitos PMNs, depende del microorganismo, antimicrobiano y de las condiciones de exposición de la bacteria a los leucocitos: fase postantibiótica o exposición continua.

13. Los estudios sobre las relaciones que se establecen entre agentes antimicrobianos, microorganismos y factores de defensa, deben incluirse de forma habitual en la investigación con nuevos antimicrobianos para una adecuada administración que considere la situación inmunológica del paciente y una dosificación más correcta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Milatovic D. (1983). Antibiotics and phagocytosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* Vol 2. 5:414-425.
2. Silleti R.P. (1986). Effect of sublethal concentrations of antibiotics on the immune system. En *Antimicrobial agents and immunity*, (Jeljaszewick J. & Pulverer G., Eds.) pp. 157-188. Academic Press. Londres.
3. Pruul, H., McDonald, P.J. (1988). Damage to bacteria by antibiotics *in vitro* and its relevance to antimicrobial chemotherapy: a historical perspective. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:695-700.
4. McDonald, P.J., Craig, W.A., Kunin, C.M. (1977). Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 135:217-223.
5. Hessen, M.T., Pitsakis, P.G., Levison, M.E. (1989). Postantibiotic effect of penicillin plus gentamicin versus *Enterococcus faecalis* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:608-611.
6. Alexander, J.W., Good, R.A. (1968). Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 71:971-983.
7. Solberg, C.O. (1978). Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. *Infection.* 6,suppl.1:116-119.
8. Horne, D., Tomasz, A. (1981). Hypersensibility of penicillin-treated group B streptococci to bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 19:745-753.
9. McDonald, P.J., Wetherall, B.L., Pruul, H. (1981). Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Reviews of Infectious Diseases.* 3:38-44.
10. Lingaas, E., Midtredt, T. (1989). The influence of cefoperazone, cefotaxima, ceftazidima and aztreonam on phagocytosis by human neutrophils *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 23:701-710.
11. Bassler, M., Baschke, H., Just, M., Daschner, F.D. (1982). Effect of ceftriaxone on *P. aeruginosa* and *S. aureus* in broth, serum and in combination with human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy.* 28:390-396.

12. Klainer A.S., Rusell R.B.B. (1974). Effect of the inhibition of protein synthesis on the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6:216-224.
13. Gemmell, C.G., O'Dowd, A. (1983). Regulation of protein A biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by certain antibiotics: its effect on phagocytosis by leukocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 12: 587-597.
14. Milatovic, D., Braveny, I., Verhoef, J. (1983). Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 24:413-417.
15. Van Oss, C.J. (1978). Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annual Review of Microbiology.* 32:19-39.
16. Lorian V., Gemmell, C.G. (1990). Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefences. En *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edition. Lorian V. Ed. pp. 493-555. Williams & Wilkins, Baltimore.
17. Lam, C., Turnowsky, F., Högenauer, G, Schütze, E. (1987). Effect of a diazaborine derivative (SA 84474) on the virulence of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 20:37-45.
18. Pruul, H., Wetherall, B.L., McDonald, P.J. (1986). *In vitro* killing of erythromycin-exposed group A streptococci by polymorphonuclear leukocytes. *European Journal of Clinical Microbiology.* 5:405-410.
19. Pruul, H., Wetherall, B.L., McDonald, P.J. (1981). Enhanced susceptibility of *Escherichia coli* to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after *in vitro* incubation with chloramphenicol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 19:945-951.
20. Gemmell, C.G., Peterson, P.K., Schmeling, D., Kim, Y., Mathews, J., Wannamaker, L., et al. (1981). Potentiation of opsonization of *Streptococcus pyogenes* following growth in the presence of clindamycin. *J. Clinical Investigation.* 67:1249-1256.
21. Lam, C., Georgopoulos, A., Laber, G., Schütze, E., Wenzel. A. (1982). *In vitro* and *in vivo* modulation of *Escherichia coli* susceptibility to PMN leukocyte microbicidal activity by a pirazole cephalosporin derivative. En: *The influence of antibiotics on the*

- host-parasite relationship. Eickenberg, H.U., Hahn, H., Opferkuch, W. (Eds.). pp. 242-254. Springer-Verlag, Berlín.
22. Pruul, H. Wetherall, B.L., McDonald, P.J. (1982). The susceptibility of antibiotic-pretreated Gram-negative bacteria to the bactericidal activity of human neutrophil granule extract. En: The influence of antibiotics on the host-parasite relationship. Eickenberg, H.U., Hahn, H., Opferkuch, W. (Eds.). pp. 208-218. Springer-Verlag, Berlín.
23. Thys, J.P., Husson, M., Klastersky, J. (1984). Inactivation of netilmicin and amikacin by intact or disrupted leukocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 14:435-438.
24. Pemán, J., Cantón, E., Román, M.S., Jimenez, T., Gobernado, M. (1991). Penetración y actividad de los antimicrobianos en el interior de los fagocitos. *Rev. Esp. Quimioterapia.* Vol. 4(1):27-36.
25. Hand, W.L., King-Thompson, N.L. (1986). Contrasts between phagocyte antibiotics uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol. 29, 1:135-140.
26. Forsgren, A. Schmeling, D. (1977). Effect of antibiotics on chemotaxis of human leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:580-584.
27. van Rensberg, C.E., Anderson, R., Joone, G., van der Merwe, A.J., van Rensberg, A.J. (1981). Effects of erythromycin on cellular and humoral immune functions *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* 8: 467-474.
28. Anderson, R. (1989). Erythromycin and roxythromycin potentiate human neutrophil locomotion *in vitro* by inhibition of leukoattractant-activated superoxide generation and autooxidation. *J. Infect. Dis.* 159:966-973.
29. Gemmell, C.G. (1993). Antibiotics and neutrophil function-potential immunomodulating effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 31;suppl.B:23-33.
30. Labro, M.T., Babin-Chevaye, C., Hakim, J. (1986). Effects of cefotaxime and ceftazidime on human granulocyte functions *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18:233-237.
31. Hoger, P.H., Vosbeck, K., Seger, R., Hitzig, W.H. (1985). Uptake, intracellular activity and influence of rifampin on normal function of polymorphonuclear leukocytes.

- Antimicrob. Agents Chemother. 28:667-674.
32. Mandell, L.A. (1982). Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 4:683-697.
33. Elferink, J.G.R., Deierkauf, M. (1984). Inhibition of polymorphonuclear leukocyte functions by chlortetracycline. *Biochemical Pharmacology.* 33:3667-3673.
34. Venezia, F.R., Di Vincenzo, C.A. (1985). Effects of aminoglycosides antibiotics on polymorphonuclear leukocyte function *in vivo*. *antimicrob. Agents Chemother.* 27:712-714.
35. Labro, M.T., Amit, N., Babin-Chevaye, C., Hakim, J. (1986). Synergie between RU 28965 (roxithromycin) and human neutrophils for bactericidal activity *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:137-142.
36. Labro, M.T., Babin-Chevaye, C. (1989). Synergie bactericide de la josamycine et des polynucléaires neutrophiles humains *in vitro*. *Pathologie et Biologie.* 37:329-334.
37. Labro, M.T., El Benna, J. (1991). Effects of anti-infectious agents on polymorphonuclear neutrophils. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol.10,2:124-131.
38. Boogaerst, M.A., Malbrain, S., Scheers, W. et al. (1986). Effect of quinolones on granulocyte function *in vitro*. *Infection.* 14, supl. 4:252-262.
39. Braga, P.C., Piatti, G., Limoli, A., Santoro, M., Gazzola, T. (1993). Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentration: brodimoprim vs. trimethoprim. *Journal of Chemotherapy.* Vol.5, 6:447-452.
40. Gemmell, C.G., Amir, M.F.A. (1979). Effects of certain antibiotics on the formation of cellular antigens and extracellular products by group A streptococci. En: *Pathogenic Streptococci.* Parker, M.T. Ed. pp.67-68. Reedbooks, England.
41. Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., Quie, P.G. (1977). Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infection and Immunity.* 15:760-764.
42. Raponi, G., Vreede, R.W., Rozenberg-Arska, M., Hoepelman, I.M., Keller, N., Verhoef, J. (1989). The influence of subminimal inhibitory concentrations of netilmicin and ceftriaxone on the interaction of *Escherichia coli* with host defences. *J. Antimicrob. Chemother.* 23, 565-576.

-
43. Veringa, E.M., Box, A., Rozenberg-Arska, M., Verhoef, J. (1988). Monobactam antibiotics in subinhibitory concentrations enhance opsonophagocytosis and serum bacteriolysis in certain *Escherichia coli* strains. *Drugs under experimental and clinical research*. 14:1-8.
44. Cates, L.K., Caparas, L.(1981). Neutrophil (PMN) killing of *Haemophilus influenzae* b: effect of pretreatment with ampicillin and chloramphenicol. En program and Abstracts of the Twenty-First Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract 658. American Society for Microbiology. Washington D.C.
45. Gemmell, C.G., Peterson, P.K., Schmeling, D., Mathews, J., Quie, P.G. (1983). Antibiotic-induced modification of *Bacteroides fragilis* and its susceptibility to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2, 327-334.
46. Veringa, E.M., Ferguson, D.A., Lambe, D.W., Verhoef, J. (1989). The role of glycocalyx in surface phagocytosis of *Bacteroides* spp. in the presence and absence of clindamycin. *J. Antimicrob. Chemotherapy*. 23:711-720.
47. Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F. (1988). Enhanced phagocytosis, killing and serum sensitivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* treated with sub-MICs of imipenem. *Vol.32; 7:1012-1018*.
48. Pruul, H., Lewis, G, McDonald, P.J. (1988). Enhanced susceptibility of gram-negative bacteria to phagocytic killing by human polymorphonuclear leukocytes after brief exposure to aztreonam. *J. Antimicrob. Chemother.* 22 (suppl.B):675-686.
49. Flynn, P.M., Shenep, J.L., Gigliotti, F., Davis, D.S., Hildner, W.K. (1988). Immunolabeling of lipopolysaccharide liberated from antibiotic-treated *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 56:2760-2762.
50. Overbeck, B.P., Schollekens, J.F.P., Lippe, W., Dekker, B.A.T., Verhoef, J. (1987). Carumonan enhances reactivity of *Escherichia coli* with mono- and polyclonal antisera to rough mutant *Escherichia coli* J5. *J. Clin. Microbiol.* 25:1009-1013.
51. Roszkowski, W., Roszkowski, K., Jeljaszewick, J., Pulverer, G. (1986). Antibacterial agents and the immune system. En *Antimicrobial agents and immunity*,

-
- (Jeljaszewick J. & Pulverer G., Eds.) pp. 1-18. Academic Press, London.
52. Gutierrez, J., Liébana, J., Maroto, M.C., Piédrola, G. (1990). Efecto de las concentraciones subinhibitorias de ceftazidima, clindamicina y gentamicina sobre la fagocitosis de bacterias aerobias por leucocitos neutrófilos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 3:1:47-53.
53. Labro, M.T., Pochet, I., Babin-Chevaye, C., Hakim, J. (1987). Effect of ceftriaxone-induced alterations of bacteria on neutrophil bactericidal function. *J. Antimicrob. Chemother.* 20:857-869.
54. Labro, M.T., Babin-Chevaye, C., Hakim, J. (1988). Influence of subinhibitory concentrations of ceftriaxone on opsonization and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:341-352.
55. Parker, R.F., Luse, S. (1977). The action of penicillin on *Staphylococcus*: further observations on the effect of a short exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 135:217-223.
56. Eagle, H., Fleischman, R., Levy, M. (1953). "Continuous" vs "discontinuous" therapy with penicillin. The effect of the interval between infections on therapeutic efficacy. *N. Engl. J. Med.* 248:481-488.
57. Wilson, D.A., Rolinson, G.N. (1979). The recovery period following exposure of bacteria to penicillins. *Chemother.* 25:14-22.
58. Webster, C., Ghazanfar, K., Slack, R. (1988). Subinhibitory and postantibiotic effects of spiramycin and erythromycin on *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22 (supp.B):33-39.
59. McDonald, P.J., Pruul, H., Wetherall, B.L. (1983). Susceptibility of antibiotic-damaged bacteria to leukocytes. En: *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy*. Spitzzy, K.H., Karrer, K., Egermann, V.H. Eds., pp.2-5. Viena. Austria.
60. Pruul, H., Hill, N., McDonald, P.J. (1984). Enoxacin-induced alteration of susceptibility of pneumococci and *Pseudomonas* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 14 (suppl.C):19-31.
61. Pruul, H., McDonald, P.J. (1979). Enhancement leukocyte activity against

Escherichia coli after brief exposure to chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol.16; 6:695-700.

62. Craig, W.A., Gudmundsson, S. (1991). The postantibiotic effect. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lorian, V. Ed. 3^a. ed. pp. 403-431. Williams and Wilkins. Baltimore.

63. Magnusson, K.E., Stendahl, O. Tagesson, C., Edebo, L., Johansson, G. (1977). The tendency of smooth and rough *Salmonella typhimurium* bacteria and lipopolysaccharide to hydrophobic and ionic interactions, as studied in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica.* 85:212-218.

64. Lorian, V., Waluschka, A. (1972). Blood cultures showing aberrant forms of bacteria. *J. Clin. Pathol.* 57:406-409.

65. Lorian, V., Atkinson, B. (1984). Bactericidal effect of polymorphonuclear neutrophils on antibiotic-induced filaments of gram-negative bacilli. *J. Infect. Dis.* 149:719-727.

66. Eagle, H. (1949). The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Clin. Invest.* 28:832-836.

67. Eagle, H., Fleischman, R., Musselman, A.D. (1950). The bactericidal action of penicillin *in vivo*: the participation of the host, and the slow recovery of surviving organisms. *Ann. Intern. Med.* 33:544-571.

68. Gerber, A.U., Craig, W.A. (1981). Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 8:81-91.

69. Bryan, L.E., Godfrey, A.J. (1991). β -lactam antibiotics: Mode of action and bacterial resistance. En: *Antibiotics in laboratory Medicine*. Lorian, V. Ed. 3^a ed. pp 559-664. Williams and Wilkins, Baltimore .

70. Neu, H.C. (1989). Betalactamasas: Una perspectiva sobre la contribución de estos enzimas a la resistencia bacteriana. En: *Augmentin. Revisión microbiológica, farmacológica y clínica*. Ed.: Laboratorios Beecham S.A. pp 3-18. Temis S.A., Barcelona.

71. Dámaso, D., Moreno-López M., Daza R.M. (1984). Antibióticos y quimioterápicos

- antibacterianos. Uso clínico. Ed.: Grutesa. p 133. Madrid.
72. Rodríguez-Tebar, A., Rojo, F., Montilla, J.C., Vazquez, D. (1982). FEMS. Microbiology Letters. 14: 295.
73. Suzuki, H., Nishimura, Y., Hirota, Y. (1978). On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 664-668.
74. Broome-Smith, J.K., Spratt, B.G. (1982). Deletion of penicillin-binding protein G gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 152: 904-906.
75. Spratt, B.G. (1980). Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. Philos. Trans. R. Soc. Lon. (Bio.). 289: (Ser B) 273-283.
76. Campoli-Richards, D.M., Brogden, R.N. (1987). Sulbactam/ampicillin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutical use. Drugs. 33: 577-609.
77. Birnbaum, J., Kahan, F.M., Kropp, H., McDonald J.S. (1985). Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: discovery and development of imipenem/cilastatin. Am. J. Med. 78: Suppl. 6 A: 3-21.
78. Spratt, B.G. Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. European Journal of Biochemist. 72; 341-352.
79. Kropp, H., Sundelof, J.G., Kahan, J.S., Kahan, F.M., Birnbaum, J. MK 0787 (N-formimidoyl thienamycin). Evaluation of in vitro and in vivo activities. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1980; 17: 993-1000.
80. Borobio, M.V., Nogales, M.C., Pascual, A., Perea, E.J. N-Formimidoyl thienamycin activity against anaerobes: effect of the inoculum, pH and culture media. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1981; 8: 213-218.
81. Wise, R., Andrews, J.M., Patel, N. N-formimidoyl thienamycin: a novel beta-lactam: An in vitro comparison with other beta-lactam antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1981; 7: 521-529.
82. Neu, H.C., Labthavikul, P. Comparative in vitro activity of N-formimidoyl thienamycin against Gram-positive and Gram-negative aerobic and anaerobic species and its beta-lactamase stability. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1982; 21: 180-

187.

83. Yotsuji, A., Minami, S., Inoue, M., Mitsuashi, S. Properties of a novel β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1983; 24: 925-929.

84. Saino, K., Kobayashi, F., Inoue, M., Mitsuashi, S. Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 22: 564-570.

85. Geddes, A.M., Stille, W. Imipenem: the first thienamycin antibiotic. *Reviews of Infectious Diseases.* 1985; 7 (Suppl.3): S353-S356.

86. Kropp, H., Gerckens, L., Sundelof, J.G., Kahan, F.M. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7 (Suppl.3): S 389-S410.

87. Greenberg, R.N., Bollinger, M.R., Alivisatos, M.R. In vitro activity of piperacillin, ticarcillin, mezlocillin, ticarcillin-clavulanic acid, aztreonam, ceftazidime, azlocillin, cefoperazone and thienamycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Ther.* 1986; 8: 655-667.

88. Braveny, I. In vitro activity of imipenem: a review. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1984; 3: 456-462.

89. Barza, M. Imipenem: first of a new class of betalactam antibiotics. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103: 552-560.

90. Wise, R., Donovan, I.A., Lockley, M.R., Drumm, J., Andrews, J.M. The pharmacokinetics and tissue penetration of imipenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1986; 18 (Suppl.E): 93-101.

91. Drusano, G.L. An overview of the pharmacology of imipenem/cilastatin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1986; 18 (Suppl.E): 79-92.

92. Prats, G., Mirelis, B. Actividad in vitro del imipenem. *Drugs of Today.* 1989; 25: (Supl.3): 25-36.

93. Rogers, J.D., Meisinger, M.A.P., Ferber, F., Calandra, G.B., Demetriades, J.L., Bland, J.A. Pharmacokinetics of Imipenem and cilastatin in volunteers. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7 (Suppl.3): S 435-S 446.

-
94. Norrby, S.R., Björnegård, B., Ferber, F., Jones, K.H. Pharmacokinetics of imipenem and cilastatin in healthy volunteers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1983; 12 (Suppl.D): 109-124.
95. Wang, C., Calandra, G.B., Aziz, M.A., Kenneth, R.B. Efficacy and safety of imipenem/cilastatin: a review of worldwide clinical experience. *Reviews of Infectious Diseases*. 1985; 7 (Suppl.3): S 528-S 536.
96. Martínez-Beltrán, J. Nuevos monobactams y carbapenems. Comunicación: M 2/3. IV Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid 1990.
97. Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., Sentochnik, D.E. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 1989; 24 (Suppl.A): 1-7.
98. Edwards, J.R., Turner, P.J., Wannop, C., Withnell, E.S., Grindey, A.J., Nairn, K. In vitro antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; No.2. 33: 215-222.
99. Jones, R.N., Barry, A.L., Thornsberry, C. In vitro studies on meropenem. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 24 (Suppl.A): 9-29.
100. Sumita, Y., Fukasawa, M., Okuda, T. Abstr. no. 756. 27th ICAAC 1987.
101. Neu, H.C., Novelli, A., Nai-Xun C. In vitro activity and β -lactamase stability of a new carbapenem, SM-7338. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989; 33 No.7; 1009-1018.
102. Martínez-Beltrán, J., Loza, E., Ródenas, E., Catalán, P., Morosini, M.L., Negri C., Cantón, R., Baquero, F. Meropenem: Estudio "in vitro" de un nuevo carbapenem con elevada actividad intrínseca. Comunicación: C 3/12. IV Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid 1990.
103. Wise, R., Logan, M., Cooper, M., Ashby, J.P., Andrews, J.M. Meropenem Pharmacokinetics and penetration into an inflammatory exudate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990; 34 No. 8; 1515-1517.
104. Ravizzola, R., Pinsi, G., Gonzales, R., Colombrita, D., Pirali, F., Turano, A. Antibacterial activity of the new carbapenem meropenem (SM-7338) against clinical

- isolates. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 1989; 8: 1053-1061.
105. Jones, R.N., Aldridge, K.E., Allen, S.D., Barry, A.L., Fuchs, P.C., Gerlach, E.H., Pfaller, M.A. Multicenter in vitro evaluation of SM-7338, a new carbapenem. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1989; 33 No. 4: 562-565.
106. Patel, J.B., Giles, R.E. Meropenem: evidence of lack of proconvulsive tendency in mice. J. Antimicrob. Chemother. 1989; 24 (Suppl. A): 307-309.
107. Topham, J.C., Murgatroyd, L.B., Jones, D.V., Goonetilleke, U.R.P., Wright, J. Safety evaluation of meropenem in animal studies on the kidney. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1989; 24 (Suppl. A): 237-306.
108. Donowitz, G.R., Mandell, G.L. (1988). Beta-lactam antibiotics. New England J. Med. Vol.318; 7:419-426.
109. Grassi, G.G., Grassi, C. (1993). Cefepime: overview of activity *in vitro* and *in vivo*. J. Antimicrob. Chemother. 32, suppl.B:87-94.
110. Pucci, M.J., Boice-Sowek, J., Kessler, R.E., Dougherty, T.J. (1991). Comparison of cefepime, cefpirome and cefaclidine binding affinities for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* SC 8329. Antimicrob. Agents Chemother. Vol.35; 11:2312-2317.
111. Bellido, F., Pechère, J.C., Hancock, R.E.W. (1991). Novel method for measurement of outer membrane permeability to new β -lactams in intact *Enterobacter cloacae* cells. Antimicrob. Agents Chemother. Vol.35; 1:68-72.
112. Dornbusch, K., Mörtzell, E., Göransson, E. (1990). In vitro activity of cefepime, a new parenteral cephalosporin, against recent european blood isolates and in comparison with piperacillin/tazobactam. Chemotherapy. 36;259-267.
113. Bodey, G.P., Ho, D.H., Leblanc, B. (1985). In vitro studies of BMY-28142, a new broad-spectrum cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 27; 2:265-269.
114. Neu, H.C., Chin, N.X., Jules, K., Labthavikul, P. (1986). The activity of BMY-28142 a new broad spectrum beta-lactamase stable cephalopirin. J. Antimicrob. Chemother. 17:441-452.
115. Phelps, D.J., Carlton, D.D., Farrell, C.A., Kessler, R.E. (1986). Affinity of

- cephalosporins for beta-lactamases as a factor in antibacterial efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:845-848.
116. Kessler, R.E., Bies, M., Buck, R.E., Chisholm, D.R., Pursiano, T.A., Tsai, Y.H., Misiek, M., Price, K.E., Leitner, F. (1985). Comparison of a new cephalosporin, BMY-28142, with other broad-spectrum β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:207-216.
117. Barbhaiya, R.H., Knupp, C.A., Tenney, J., Martin, R.R., Donald, J., Weidler, M.D., Pittman, K.A. (1990). Safety, tolerance and pharmacokinetics of cefepime administered intramuscularly to healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* Vol. 30;10:900-910.
118. Barbhaiya, R.H., Knupp, C.A., Fogue, S.T., Matzke, G.R., Pitman, K.A. (1990). Pharmacokinetics of cefepime in subjects with renal insufficiency. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48:268-276.
119. Tremblay, D., Dupront, A., Ho, C., Coussediere, D., Lenfant, B. (1990). Pharmacokinetics of cefpodoxime in young and elderly volunteers after single doses. *J. Antimicrob. Chemother.* 26, suppl.E:21-28.
120. Knothe, H., Shah, P.M., Eckhart, O. (1991). Cefpodoxime: Comparative antibacterial activity, influence of growth conditions, and bactericidal activity. *Infection* 19; 5:370-376.
121. Wise, R., Andrews, J.M., Ashby, J.P., Thornsberry, D. (1990). The *in vitro* activity of cefpodoxime: a comparison with other oral cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 25:541-549.
122. Chin, N.X., Neu, H.C. (1988). *In vitro* activity of an oral iminomethoxy aminothiazolyl cephalosporin, R-3746. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:15-22.
123. Holt, H.A., Bywater, M.J., Reeves, D.S. (1990). *In vitro* activity of cefpodoxime against 1834 isolates from domiciliary infections at 20 U.K. centres. *J. Antimicrob. Chemother.* 26 suppl.E:7-12.
124. Eggleton, P., Gargan, R., Fisher, D. (1989). Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J. Immunol. Methods.* 121:105-113.

-
125. Jones, R.N., Barry, A. L., Gavan, T.L., Washington, J.A. (1985). Susceptibility test: Microdilution and macrodilution broth procedures. In *Manual of Clinical Microbiology*, (Lenette, E.H., Balows, A.S., Hausler, W.J., Shadomy, H.J. Eds.) 4th Ed. 972-977. American Society for Microbiology, Washington.
126. Gargan, R.A., Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J.M.T. (1989). Failure of water to lyse polymorphonuclear neutrophils completely. Role of pH and implications for assessment of bacterial killing. *J. Immunol. Methods*. 124:289-291.
127. Ilstrup, D.M. *Statistical methods in Microbiology*. (1990). *Clinical Microb. Reviews*. 219-226.
128. Hindler, J.A., González, A.H., Drake, T. (1990). Stability of viable bacterium counts in liquid media used for preparation of inocula and subsequent impact on antimicrobial susceptibility test results. *J. Clinical Microbiol.* Vol.28; 6:1271-1275.
129. McFarland, J. (1907). Nephelometer: on instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the index for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 14:1176-1275.
130. Soriano, F. (1992). Optimal dosage of β -lactam antibiotics: time above the MIC and inoculum effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:566-569.
131. Parker, R.F., Marsh, H.C. (1946). The action penicillin on *Staphylococcus*. *J. Bacteriol.* 51:181-186.
132. Lichtman, M.A., Weed, R.I. (1969). The monovalent cation content and adenosine triphosphatase activity of human normal leukemic granulocytes and lymphocytes: Relationship to cell volume and morphologic age. *Blood*. 34: 645.
133. Nelson, R.D., Quie, P.G., Simmons, R.L. (1975). Chemotaxis under agarose : A new simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* 115: 1650.
134. Jarstrand, C., Lahnberg, G., Berghem, L. (1979). Human granulocyte function during dextran infusion. *Acta Chir. Scand.* 489 (Suppl.), 279.
135. Hill, R.S., Norris-Jones, R., Still, B., Brooks, D.E. (1986). Surface charge and hydrophobic properties of fresh and cryopreserved blood phagocytes as determined by partitioning in two phase aqueous polymer systems. *Am. J. Haematol.* 21: 249.

-
136. Wakefield, J.S.J., Gale, J.S., Berridge, M.V., Jordan, T.W., Ford, H.C. (1982). Is percoll innocuous to cells?. *Biochem. J.* 202; 795.
137. Roth, J.A., Kaerberle, M.L. (1981). Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. *J. Immunol. Methods.* 45; 153.
138. Poston, L., Jones, R.B., Hilton, P.J. (1982). Sodium transport on polymorphonuclear leukocytes: Effect of isolation by the Ficoll/Triosill method. *Clin. Sci.* 62; 563.
139. Haslett, C., Guthrie, L.A. Kopamak, M.H., Johnston Jr, R.B., Henson, P.H. (1985). Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.* 119: 101.
140. Bignold, L.P. (1988). Preparative techniques influencing sedimentation of erythrocytes through the Hypaque-Ficoll medium used in the one-step technique for the separation of human polymorphonuclear leukocytes from whole blood. *J. Immunol. Methods.* 106: 147.
141. Ernst, J.D., Decazes, J.M., Zack, O., Hegstler, B., Sander, M.A. (1982). Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes (WBC) in pathogenesis (abstract 237). En: Program and abstracts of 22nd. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C.. American Society for Microbiology.
142. Feldman, W.E. (1977). Relation of concentrations of bacteria and bacterial antigen in cerebrospinal fluid to prognosis in patients with bacterial meningitis. *N. England J. Med.* 296:433-435.
143. Lorian, V., Waluschka, A., Kim, Y. (1982). Abnormal morphology of bacteria in the sputum of patients treated with antibiotics. *J. Clin. Microb.* 16:382-386.
144. Babior, B.M., Cohen, H.J. (1981). Measurement of neutrophils function: phagocytosis, degranulation, the respiratory burst and bactericidal killing. En: *Methods in Haematology.* M.J. Cline (Ed.). Vol. 3. p.1. Churchill-Livingstone. New York.
145. Leigh, P.C.J., Van Furth, R., Van Zwet, T.L. (1986). *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear

- phagocytes. En: Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (Ed.). p. 461. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
146. Triger, D.R., Smith, J.W.G. (1966). Survival of urinary leukocytes. J. Clin. Pathol. 19:443.
147. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1988). Tentative standard M7-T2. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova.
148. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1988). Tentative standard M2-T4. Performance standars for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova.
149. de Nollin, S., van Belle, H., Goosens, F., Thone, F., Borgers, M. (1977). Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 1:500-513.
150. Bundtzen, R.W., Gerber, A.U., Cohn, D., Craig, W.A. (1981). Postantibiotic suppression of bacterial growth. Rev. Infect. Dis. 3:28-37.
151. Craig, W.A., Ebert, S.C. (1991). Killing and regrowth of bacteria *in vitro*. Review Scand. J. Infect. Dis. 74 (suppl.):63-70.
152. Hanberger, H., Nilsson, Kihstrom, E., Maller, R. (1990). Postantibiotic effect of β -lactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. Antimicrob. Agents Chemother. 34:102-106.
153. Hanberger, H., Nilsson, L.E., Maller, R., Nilsson, M. (1991). Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria:initial killing, morphology and postantibiotic effect. Review Scand. J. Infect. Dis. 74 (suppl.):118-123.
154. Bustamante, C.I., Drusano, G.L., Tatem, B.A., Satandiford, H.C. (1984). Postantibiotic effect of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 26:678-682.
155. Gudmundsson, S., Vogelmann, B., Craig, W.A. (1986). The *in vivo* postantibiotic effect of imipenem d other new antimicrobials. J.Antimicrob. Chemother. 18 (suppl.E):67-73.

-
156. Eagle, H., Musselman, A.D. (1949). The slow recovery of bacteria from the toxic effect of penicillin. *J. Bacteriol.* 58:475-490.
157. Parker, R.F., Luse, S. (1948). The action of penicillin on *Staphylococcus*: further observations on the effect of a short exposure. *J. Bacteriol.* 56: 75-84.
158. Tosch, W. Comunicación personal citada en la referencia (62).
159. Colera, M., Chatterjee, A.N., Gilpin, R.W., Young, F.E. (1974). Ultrastructure of teichoic acid deficient and other mutants of staphylococci. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 238:22-53.
160. Baquero, F., Culebras, E., Patrón, C., Pérez-Díaz, J.C., Medrano, J.C., Vicente, M.F. (1986). Postantibiotic effect of imipenem on Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 18, (suppl.E) :47-59.
161. Zhang, L., Mattie, H. (1992). Antistaphylococcal and postantibiotic effect of meropenem and doxycillin *in vitro*. *Rev. Esp. Quimioterap.* Vol.5 (suppl.4): 21-25.
162. Frampton, J.E., Brodgen, R.N., Langtry, H.D., Buckey, M. (1992). Cefpodoxima proxetil: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drug evaluation. Drugs.* 44(5):889-917.
163. Blandino, G., Caccamo, F., di Marco, R., Nicoletti, A., Spociale, A., Nicoletti, G. (1992). Bactericidal activity and postantibiotic effect of cefdinir (CL 983, FK 482) against selected pathogens. *Drugs Exp. Cli. Res.* 18 (8):319-327.
164. Roitt, I.M. (1975). *Inmunología Esencial.* JIMS Ed. 2ª ed. Barcelona.
165. Horwitz, M.A., Silverstein, S.C. (1980). Influence of the *E. coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J. Clin. Invest.* 65: 82-94.
166. Frank, M.M., Joiner, K., Hammer, C. (1987). The function of antibody and complement in the lysis of bacteria. *Reviews Infect. Dis.* 9(suppl.5):537-545.
167. Cross, A. S., Gemski, P., Sadoff, J.C., Orskov, F., Orskov, I. (1984). The importance of the K capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli* 149:184-193.
168. Friedman, H., Warren, G.H. (1974). Enhanced susceptibility of penicillin resistant staphylococci to phagocytosis after *in vitro* incubation with low doses of nafcillin. *Proc.*

Soc. Exp. Biol. Med. 146:707-711.

169. Gordon, A.L., Rice, J., Finlay-Jones, J., McDonald, P.J., Hosletter, M.K. (1988). Analysis of C3, deposition and degradation on bacterial surfaces after opsonization. *J. Infect. Dis.* 157:1113-1119.

170. Opferkuch, W. (1982). The influence of subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics on the antibody-independent binding of the first component of complement by *Escherichia coli*. En: The influence of antibiotics on the host-parasite relationship. Eickenberg, H.U., Hahn, H., Opferkuch, W. (Eds.). pp. 263. Springer-Verlag, Berlín.

171. Hart, R.F., Reynard, A.M., Cunningham, R.K. (1982). Effects of antibiotics on the bactericidal activity of normal human serum. En: The influence of antibiotics on the host-parasite relationship. Eickenberg, H.U., Hahn, H., Opferkuch, W. (Eds.). pp. 255-262. Springer-Verlag, Berlín.

172. Wright, S.D., Levin, R.P. (1981). How complement kills *E. coli* I. Location of the lethal lesion. *J. Immunol.* 127:1146-1151.

173. Wright, S.D., Levin, R.P. (1981). How complement kills *E. coli* II. The aparent two-hit nature of letal event. *J. Immunol.* 127:1152-1156.

174. Mandell, G.L. (1973). Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics. *J. Clin. Invest.* 52:1673-1679.

175. Loos, M., Welleck, B., Thesen, R., Opferkuch, W. (1978). Antibody-independent interaction of the first component of complement with Gram- negative bacteria. *Infection and Immunity.* 22:5-9.

176. Betz, S.J., Isliker, H. (1981). Antibody independent interaction between *E. coli* 35 and human complement components. *J. Immun.* 127:1748-54.

177. Claas, F., Loos, M. (1981). Antibody independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms on *Salmonella minnesota*. *Infection and Immunity.* 31:1138-1144.

178. Dutchner, B.S., Reynard, A.M., Back, M.E., Cunningham, R.K. (1978). Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:820-826.

179. Taylor, P.W., Gaunt, W.H., Unger, F.M. (1981). Effect of subinhibitory

- concentrations of mecillinam on the serum susceptibility of *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:986-988.
180. Alexander, W.J. (1980). Modification of bacterial serum susceptibility by rifampicin. *Infect. Immun.* 28:923-926.
181. Pruul, H., McDonald, P.J. (1990). Lomefloxacin-induced modification of kinetics of growth of Gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother.* 25:91-101.
182. Lorian, V., Atkinson, B. (1979). Effect of serum on Gram-positive cocci in the presence of penicillin. *J. Infect. Dis.* 138:865-871.
183. Davidsson, R.J., Zhanel, G.G., Phillips, R., Hoban, D.J. (1991). Human serum enhances the postantibiotic effect of fluorquinolones against *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1261-1263.
184. Pérez, P., Herrera, I., Martínez, P., Gómez-Lus, M.L., Prieto, J. (1994). Enhancement of the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to phagocytosis after treatment with fosfomicin compared with other antimicrobial agents. *Chemotherapy*. (En prensa).
185. Peterson, P.K., Verhoef, J., Schmeling, D., Quie, P.G. (1977). Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Infect. Dis.* Vol.136; 4:502-509.
186. Stendahl, O. The physico-chemical basis of surface interaction between bacteria and phagocytic cells. En: *Role of the envelope in the survival of bacteria*. *Infection Medical Microbiology*. C.S.F. Easmon, J. Jeljaszewick, M.R.W. Brown, P.A. Lambert (Eds.). Vol.3, pp 137-152. Academic Press. Londres.
187. Rogers, D.E., Tompsett, R. (1952). The survival of staphylococci within human leukocytes. *J. Experimental Medicine*.95:209-230.
188. Lorian, V., de Freitas, O. (1979). The minimum antibiotic concentrations (MACs) of aminoglycosides and betalactams antibiotics from some Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci. *J. Infect. Dis.* 139:599-603.
189. Pérez Fernández P. (1994). Modificación de la actividad bactericida de los leucocitos polimorfonucleares humanos por el pretratamiento antimicrobiano de *E. coli*

y *S. aureus*. Tesis Doctoral. Madrid.

190. Fine, D.P. (1975). Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect.Immun.* 12:772-778.
191. Veringa, E.M., Verhoef, J. (1987). Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody- and complement-dependent phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes of *Staphylococcus aureus*. 33:243-249.
192. Raponi, G., Keller, N., Rozenberg-Arska, M., Hoepelman, I.M. (1989). The influence of cefepime on opsonophagocytosis of bacteria. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 25;4:141-144.
193. García, I., Pascual, A., Guzmán, M.C., Perea, E.J. (1991). Efecto de miocamicina y eritromicina en la actividad de los neutrófilos humanos sobre *Staphylococcus aureus*. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* Vol.9;8.
194. Pruul, H., McDonald, P.J. (1993). Cefdinir-induced modification of the susceptibility of bacteria to the antibacterial activity of human serum and polymorphonuclear neutrophils. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 12;3:170-176.
195. Lorian, V., Sabath, L.D. (1972). Penicillins and cephalosporins: differences in morphologic effects of *Proteus mirabilis*. *J.Infect. Dis.* 125: 560-564.
196. Burnie, J., Matthews, R. (1985). BMY-28142. *Drugs of the future.* Vol.10. No.10.
197. Roussel. Cefpodoxima proxetil. Monografía de producto para farmacéuticos de hospital.
198. Craig, A.W., Ebert, S.C. (1992). Continuous infusion of β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2577-2583.
199. Hanberger, H., Nilsson, L.E., Nilsson, M., Maller, R. (1991). Postantibiotic effect of β -lactam antibiotics on Gram-negative bacteria in relation to morphology, initial killing and MIC. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 10:927-934.
200. Simposium Imipenem. Roma 25-26 Abril 1986. *J.Antimicrob.Chemother.* 18,(Suppl.E):78.
201. Tuslane, R., Vendrely, R. (1948). Cytology of staphylococci before and after

- treatment with penicillin. *Nature*. 161:316-317.
202. Root, R.K., Isturiz, R., Molavi, A., Metcalf, J.A. (1981). Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci. *J. Clin. Invest.* 67:247-259.
203. Shah, P.M., Junghanns, W., Stille, W. (1976). Dosis-Wirkungs-Beziehung der Bakterizidie bei *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 101:325-328.
204. Nishida, M., Marakowa, T., Kamimura, T., Okada, N. (1978). Bacterial activity of cephalosporins in an *in vitro* model simulating serum levels. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:6-12.
205. Nishino, T., Nakazawa, S. (1976). Bacteriological study on effects of beta-lactam group antibiotics in high concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:1033-1042.
206. Kirby, W.M.M. (1945). Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant staphylococci. *J.Clin.Invest.* 24:165-169.
207. Holm, S.E., Tornqvist, I.O., Cars, O. (1991). Paradoxical effects of antibiotics. *Scand.J.Infect.Dis.* 74 (Suppl.):113-117.
208. Daschner, F.D. (1985). Antibiotics and host defence with special reference to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 16:135-141.
209. Hand, W.L., King-Thompson N., Holman, J.W. (1987). Entry of roxithromycin (RU 965), imipenem, cefotaxime, trimethoprim and metronidazole into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1553-1557.
210. Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F. (1988). Intraphagocytic activity of imipenem and piperacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:508-510.
211. Easmon, C.S.F. (1989). Interaction of meropenem with humoral and phagocytic defences. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (Suppl.A):259-264.
212. Gnarpe, H., Belsheim, J. (1986). Interaction of antibiotics with granulocytes and lymphocytes. En: *Antimicrobial Agents and Immunity*. Jeljaszewick J., Pulverer, G. (eds.), pp.131-156. Academic Press. Londres.
213. Mandell, L.A., Afnan, M. (1991). Mechanisms of interaction among subinhibitory

concentrations of antibiotics, human polymorphonuclear neutrophils and Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents and Chemother.* Vol.35;7:1291-1297.

214. Prokesch, R.C., Hand, W.L. (1982). Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:373-380.

215. Adinolfi, L.E., Utili, R., Dilillo, M., Tripodi, M.F., Attanasio, V., Ruggiero, G. (1989). Intracellular activity of cefamandole and aztreonam against phagocytosed *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 927-935.

216. Cuffini, A.M., Tullio, V., Allocco, A., Fazari, S., Gianchino, F., Carlone, N.A. (1993). Enhanced *Staphylococcus aureus* susceptibility to immunodefences induced by subinhibitory and bactericidal concentrations of imipenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 31:559-568.

217. García, I., Pascual, A., Conejo, M.C., Perea, E.J. (1990). Efecto de cefpodoxima en la interacción entre los neutrófilos humanos y *Staphylococcus aureus*. IV Congreso SEIMC. Madrid.

218. Conejo, M.C., Pascual, A., Suarez, A.I., Perea, E.J. (1992). Efecto de cefepime en la adherencia y fagocytosis de *P. aeruginosa*. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* 10;10:587-591.

219. Holmes, B., Quie, P.G., Windhorst, D.B., Pollara, B., Good, R.A. (1966). Protection of phagocytized bacteria from the killing action of antibiotics. *Nature (Londres)* 210:1131-1132.

220. Yourasowsky, E., Van der Linden, M.P., Lismont, M.J., Crokaert, F., Glupezynski, Y. (1986). Effect on growth curves and killing curves of brief exposure of *Escherichia coli* to imipenem and piperacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 18,(Suppl.E):61-65.

221. Hanberger, H., Nilsson, L.E. (1994). Retain intermittent dosing of carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol.38; 1:159-161.

222. Drusano, G.L. (1988). Role of pharmacokinetics in the outcome of infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:289-297.

223. Craig, W., Ebert, S., Watanabe, Y. (1993). Differences in time above MIC (T > MIC) required for efficacy of beta-lactams in animal infection models. Abstr.86,

p.135. Program Abstr. 33rd. Intersci.Conf. Antimicrob. Agents Chemother.

APÉNDICE

Solución salina equilibrada de Hank (HBSS):- Sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}

· ClNa	8	gramos
· KCl	0,4	gramos
· $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,048	gramos
· KH_2PO_4	0,06	gramos
· Glucosa	1,0	gramos

- Reactivos adicionales para HBSS completo

· CaCl_2	0,14	gramos
· NaHCO_3	0,35	gramos
· $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,16	gramos
· $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	gramos
· Gelatina al 0,1 %		

Gelatina al 1%:

1 gramo de gelatina en polvo (Sigma, Chemical Company) se disuelve en 100 ml de agua destilada estéril y se calienta al baño María para licuarla. Se guarda en nevera hasta su uso.

Solución isotónica de cloruro amónico:

· ClNH_4	4,16	gramos
· NaHCO_3	0,42	gramos

Azul tripán al 4%:

El colorante azul Tripán (R.A.L. Ugine-Kuhlmann) se diluyen en 100 ml de agua destilada estéril y se mantiene a temperatura ambiente hasta su uso.