

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DPTO. DE MICROBIOLOGÍA II

**DESARROLLO DE UNA QUINOLONA PARA EL
TRATAMIENTO DE INFECCIONES
GENITOURINARIAS: BASES FARMACOBIOLOGICAS
EN LA PREDICCIÓN DE EFICACIA.**

TESIS DOCTORAL

M^a JOSE GIMENEZ MESTRE

Madrid, 1998



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

D. Lorenzo Aguilar Alfaro, Doctor en Medicina y Cirugía y especialista en Microbiología, Gerente de Investigación Clínica (Enfermedades Infecciosas) del Departamento Médico de SmithKline Beecham Pharmaceuticals

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado "Desarrollo de una quinolona para el tratamiento de infecciones genitourinarias: bases farmacobiológicas en la predicción de eficacia" constituye la memoria presentada por M^a José Giménez Mestre para aspirar al grado de Doctora en Farmacia, y que ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología I (Catedrático Prof. Dr. José Prieto Prieto) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste firmo el presente certificado en Madrid, Febrero de 1998.

Dr. Lorenzo Aguilar Alfaro.

A Maria

Agradecimientos

Al Dr. Lorenzo Aguilar (Dpto. Médico, SmithKline Beecham Pharmaceuticals) por su confianza, su constante ánimo a lo largo de esta Tesis, y por permitirme aprender junto a él en el difícil campo de la predicción de eficacia durante estos ocho años de trabajo conjunto y amistad.

Al Prof. José Prieto (Dpto. Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense) por la ayuda que me ha prestado sin la cual no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

Al Dr. Rafael Dal-Ré (Dpto. Médico, SmithKline Beecham Pharmaceuticals) porque su amplia visión de la Investigación Clínica me ha permitido desarrollarme profesionalmente en este campo apasionante.

A los Dres. José Javier García (Cibest, Madrid) e Ignacio Alvarez Cantalapiedra (CAEM, Madrid) por su inestimable ayuda en el análisis estadístico de los datos.

Al Dr. Joan Costa (Serv. Farmacología Clínica, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona) por su paciencia y desinteresada colaboración durante todo el análisis farmacocinético/farmacodinámico de los datos.

A todas las personas que, citadas o no, han colaborado en los estudios realizados y han contribuido con su trabajo a realizar este programa.

INDICE

	<u>Página</u>
1- INTRODUCCIÓN	1
1- Desarrollo de fármacos para infecciones genitourinarias	1
1.1- Desarrollo general	1
1.2- Desarrollo de fármacos para el tratamiento de Infecciones del Tracto Urinario	4
1.3- Desarrollo de fármacos para el tratamiento de Enfermedades de Transmisión Sexual.	8
2- Predicción de eficacia	9
2.1- General	9
2.2- En Infecciones del Tracto Urinario	13
2.3- En Enfermedades de Transmisión Sexual: gonococia	15
3- Información previa de la Quinolona	16
3.1- Descripción del producto	16
3.2- Mecanismo de acción	16
3.3- Estudios microbiológicos	17
3.4- Estudios de Fase I	17
3.5- Ensayos clínicos	18
2- OBJETIVOS	19
1- Introducción	19
2- Desarrollo de la quinolona	19
3- Objetivos generales	20
3- MATERIAL Y MÉTODOS	21
1- Diseño y coordinación de los estudios	21
2- Estudios in vitro	21
2.1- Actividad in vitro de rufloxacina frente a <i>E. coli</i>	21

2.2- Cinética de muerte bacteriana de rufloxacina frente a <i>E. coli</i> .	22
2.3- Efecto postantibiótico de rufloxacina frente a <i>E. coli</i> .	22
2.4- Susceptibilidad de las cepas aisladas en la orina de las pacientes incluidas en el ensayo Fase III en ITU	22
2.5- Determinaciones microbiológicas del ensayo Fase III en uretritis gonocócicas: aislamiento e identificación de <i>N. gonorrhoeae</i> y <i>C. trachomatis</i> en los exudados uretrales. Serología de sífilis.	23
2.6- Determinación de susceptibilidad y serotipación de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> .	24
2.7- Detección de mutaciones en los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> .	25
3- Ensayos clínicos	25
3.1- Ensayo clínico de Fase I	25
3.2- Ensayo clínico de Fase III en infecciones urinarias	26
3.3- Ensayo clínico de Fase III en uretritis gonocócica.	28
4- Estudios ex vivo	29
4.1- Determinación de niveles de antimicrobiano	29
4.1.1- Niveles séricos	29
4.1.2- Niveles en orina	30
4.1.2.1- Ensayo clínico Fase I	30
4.1.2.2- Ensayo clínico Fase III en ITU	30
4.1.3- Niveles en heces	31
4.2- Actividad bactericida sérica y en orina	32
4.2.1- Actividad bactericida sérica	32
4.2.2- Actividad bactericida en orina	32

	<u>Página</u>
4.2.2.1- Ensayo clínico Fase I	32
4.2.2.2- Ensayo clínico Fase III en ITU	33
4.3- Curvas de letalidad en orina	33
4.4- Efecto sobre la flora fecal	34
5- Predicción de eficacia	35
6- Análisis farmacocinético.	35
7- Análisis estadístico	36
7.1- Ensayo clínico Fase I	36
7.2- Ensayo clínico Fase III en ITU	37
7.3- Predicción de eficacia	37
4- RESULTADOS	38
1- Resultados microbiológicos	38
1.1- Actividad in vitro de rufloxacina frente a <i>E. coli</i>	38
1.2- Cinética de muerte bacteriana de rufloxacina frente a <i>E. coli</i>	38
1.3- Efecto postantibiótico de rufloxacina frente a <i>E. coli</i> .	38
1.4- Susceptibilidad de las cepas aisladas en la orina de las pacientes incluidas en el ensayo Fase III en ITU	39
1.5- Susceptibilidad de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> y serotipación de los mismos.	39
1.6- Mutaciones en los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> .	40
2- Resultados farmacológicos	40
2.1- Niveles séricos (Ensayo clínico Fase I)	40
2.2- Niveles en orina	41
2.2.1- Ensayo clínico Fase I	41
2.2.2- Ensayo clínico Fase III en ITU	41
2.3- Niveles en heces (Ensayo clínico Fase I)	42

	<u>Página</u>
2.4- Análisis farmacocinético de los datos obtenidos en el ensayo clínico Fase I	42
3- Resultados farmacodinámicos	43
3.1- Curvas de letalidad en orina (Ensayo clínico Fase I)	43
3.2- Actividad bactericida sérica (Ensayo clínico Fase I)	43
3.3- Actividad bactericida en orina	44
3.3.1- Ensayo clínico Fase I	44
3.3.2- Ensayo clínico Fase III en ITU	44
3.4- Estudio del efecto sobre la flora fecal	45
4- Resultados de la predicción de eficacia	46
5- Resultados clínicos	47
5.1- Ensayo clínico de Fase I	47
5.2- Ensayo clínico de Fase III en infecciones urinarias	47
5.3- Ensayo clínico de Fase III en uretritis gonocócica.	51
5- TABLAS Y FIGURAS	52
6- DISCUSIÓN	78
1- Microbiología/Elección de la patología	78
2- Farmacocinética/Pautas de dosificación	81
3- Farmacodinamia/Predicción de eficacia	85
4- Indicaciones resultantes/Utilización en clínica	94
7- CONCLUSIONES	98
8- REFERENCIAS	100

INTRODUCCION

1- DESARROLLO DE FÁRMACOS PARA INFECCIONES GENITOURINARIAS

1.1- Desarrollo general

La eficacia y seguridad de un antimicrobiano se determina mediante ensayos clínicos. Sin embargo antes de administrarse a humanos, deben realizarse estudios in vitro y en animales para obtener información sobre la actividad biológica del compuesto, sus características farmacológicas, su toxicidad y su eficacia potencial (1). A diferencia de otros fármacos, los antimicrobianos actúan sobre el agente etiológico directamente, siendo éste un organismo exógeno al huésped; por ello, la eficacia potencial de un antimicrobiano frente a distintos agentes causantes de infección, puede determinarse en cierto grado a partir de los resultados obtenidos in vitro en las pruebas clásicas de susceptibilidad (determinación de la CMI, CMB) y los datos del mecanismo de acción, características farmacocinéticas y actividad farmacodinámica del compuesto (1).

Con respecto a los ensayos clínicos, la “U.S. Food and Drug Administration” -FDA-, agencia de regulación americana, junto con la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas -IDSA- (Infectious Diseases Society of America), ha elaborado una normativa (2) para establecer todos los estudios que se requieren para la evaluación de un nuevo antimicrobiano de forma que:

- 1- Se establezca claramente la definición de los distintos grados de infección y los objetivos clínicos y microbiológicos que se deben considerar para el estudio del antimicrobiano,
- 2- Se estratifique a los pacientes de acuerdo a sus características demográficas, severidad de las enfermedades de base, infección y naturaleza del agente infectante,
- 3- Se compare el nuevo agente antiinfeccioso con los antimicrobianos estándar en cada caso, y,
- 4- Se tengan en cuenta los nuevos métodos diagnósticos y cambios en el manejo de ciertas infecciones.

El descubrimiento, investigación y desarrollo de un nuevo fármaco para su administración a humanos es un proceso complejo que requiere la integración de intereses científicos, clínicos y comerciales. El programa de desarrollo de un antimicrobiano exige la realización de estudios preclínicos y clínicos.

1.1.1-Estudios preclínicos

Los estudios preclínicos comprenden estudios *in vitro* e *in vivo*. Estos estudios se realizan antes de la primera administración experimental a humanos, para demostrar que el antimicrobiano tiene una actividad *in vitro* favorable frente a los patógenos que producen infecciones en humanos, tiene un perfil de seguridad adecuado en animales y es eficaz en los modelos de infección experimentales (3). Además el conocimiento de las propiedades farmacológicas del antimicrobiano permitirá establecer de qué manera debe administrarse en los ensayos de la Fase clínica (3)

1.1.1.1-Estudios *in vitro*

La actividad antimicrobiana *in vitro* de un nuevo compuesto debe establecerse mediante una serie de estudios *in vitro* estándar, que comprende entre otros, la determinación del espectro antimicrobiano, es decir, la actividad antibacteriana frente a un panel de bacterias incluyendo especies grampositivas y gramnegativas, aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos, mediante la determinación, entre otros parámetros, de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) (3). Estos tests constituyen el primer paso en la evaluación de la actividad antimicrobiana de un compuesto; los datos microbiológicos obtenidos antes de la realización de los ensayos clínicos deben incluir información sobre la actividad bactericida del compuesto frente a cepas de colección y aislados clínicos determinada mediante métodos estándar (4).

Los resultados obtenidos in vitro pueden no predecir la respuesta antimicrobiana in vivo, ya que las condiciones en las que se realizan, aunque intentan simular en lo posible las condiciones in vivo, son muy distintas a éstas; sin embargo, a pesar de las reservas que existen sobre su relevancia clínica, la CMI se considera generalmente como punto de referencia para comparar y evaluar otros tests de susceptibilidad y se utiliza como herramienta para describir la eficacia de los antimicrobianos (5).

1.1.1.2-Estudios in vivo

Son fundamentalmente estudios realizados en modelos animales con los siguientes objetivos (1):

- 1- Evaluar de forma preliminar la toxicidad de un compuesto para un determinado órgano o lesión
- 2- Conocer las propiedades farmacológicas de un fármaco
- 3- Proporcionar información preliminar útil en relación a selección de intervalos de dosificación para humanos
- 4- Determinar la eficacia potencial en general y en infecciones específicas, y,
- 5- Evaluar la eficacia potencial de fármacos que no puede ser evaluada adecuadamente por métodos in vitro.

1.1.2-Ensayos clínicos

Los ensayos clínicos comprenden cuatro fases: Ensayos clínicos de Fase I, Fase II, Fase III y Fase IV.

Los ensayos de Fase I constituyen la primera administración a humanos y proporcionan información sobre las características farmacocinéticas y el perfil preliminar de seguridad del compuesto. Se realizan fundamentalmente en voluntarios sanos y permiten establecer el margen de dosificación que puede utilizarse en terapéutica (6). Además en el caso de

los antibióticos, se pueden obtener datos ex vivo de eficacia, enfrentando el suero obtenido a los distintos tiempos a bacterias diana, determinando así la actividad bactericida del suero.

Los ensayos de Fase II se realizan en un número reducido de pacientes con una enfermedad específica. Son los estudios que proporcionan la primera información sobre la eficacia clínica del compuesto e información adicional sobre su seguridad (7). Van seguidos (aunque a veces en el caso de los antimicrobianos se pueden solapar las dos fases) de los ensayos de Fase III, donde se incluye un elevado número de pacientes. En esta fase, el fármaco se administra en forma semejante a como se utilizará tras obtener el registro. Su objetivo consiste en obtener amplia información de eficacia y seguridad y establecer la dosificación más adecuada para el tratamiento de una enfermedad específica (7). Los estudios deben ser comparativos con el antimicrobiano estándar para cada infección y aleatorizados, es decir que el tratamiento (grupo problema/grupo control) sea asignado al azar (8). Estos estudios proporcionan fundamentalmente el perfil de seguridad del compuesto ya que en ellos se obtiene la información más amplia sobre acontecimientos adversos e interacciones medicamentosas.

Los ensayos de Fase IV se realizan una vez se ha obtenido la aprobación del compuesto para su comercialización y se realizan para obtener datos en poblaciones especiales, nuevas indicaciones, redefinir intervalos de dosificación (1), y especialmente en el campo de los antimicrobianos, para obtener datos de eficacia con la evolución de resistencias bacterianas (9).

1.2-Desarrollo de un fármaco para el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU).

El término infección urinaria incluye un amplio número de entidades clínicas con una característica común: un cultivo de orina positivo. Sin embargo las distintas entidades difieren en lo que se refiere a presentación, significado clínico y tipo de terapia

antimicrobiana aplicada para eliminar la infección (10). Teniendo en cuenta lo anterior, es lógico que también deban diferenciarse los estudios a realizar para la evaluación de los antimicrobianos en el tratamiento de las distintas entidades englobadas en este término. La normativa FDA/IDSA en el capítulo referente a Infecciones del Tracto Urinario (ITU) (11) distingue las siguientes categorías:

- a) ITU aguda no complicada en mujeres,
- b) Pielonefritis aguda no complicada,
- c) UTI complicada y UTI en el varón,
- d) Bacteriuria asintomática, y
- e) ITU recurrente.

La diferenciación entre unas y otras categorías debe realizarse considerando los lugares anatómicos afectados, las alteraciones anatómicas y funcionales del tracto urinario, y la etiología del agente infectante. La especie causante de la infección urinaria puede ser un indicador para conocer si se trata de una ITU complicada o no complicada (12). La ITU no complicada está causada por *E. coli* (80%), *S. saprophyticus* (10-15%), *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* (12), mientras que en la ITU complicada, *E. coli* es responsable solamente de un reducido número de casos y la mayoría de infecciones están causadas por los otros microorganismos anteriormente citados así como por otros gram-negativos de las especies *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Providencia* y *Morganella*; especies gram-positivas como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* y, hongos fundamentalmente especies de *Candida* (12). Por lo que se refiere al lugar anatómico de la infección, en la bacteriuria asintomática existe evidencia de infección en orina en ausencia de signos o síntomas asociados; en la cistitis existen síntomas localizados en vejiga pero no existe evidencia de afectación renal o sistémica, mientras que en el caso de la pielonefritis, existen síntomas indicadores de afectación renal, evidencia de respuesta inflamatoria sistémica, o una combinación de ambas (13). El término ITU complicada se refiere a la presencia de alteraciones orgánicas o funcionales del tracto urinario que predisponen al establecimiento y mantenimiento de la infección. Esta clasificación de las entidades clínicas de acuerdo al órgano afectado, las alteraciones del tracto urinario y a

la etiología va a condicionar el tratamiento que deba ser aplicado en cada caso teniendo en cuenta las características de los antimicrobianos y su actividad sistémica. En cualquier caso, esta diferenciación es artificial y pueden existir procesos en que exista afectación del tracto urinario alto en infecciones asintomáticas o no complicadas (14) o procesos en que se produzca urosepsis en ausencia de afectación renal (15). Además, la ITU es un proceso dinámico, y por ello el conocimiento en un momento determinado de que la infección se limita a la vejiga no excluye que pueda desarrollarse infección renal con el mismo microorganismo en un estadio más avanzado de la infección (16).

En relación al tratamiento a aplicar en cada caso, en general la aplicación y duración del mismo debe aumentar proporcionalmente a la severidad del síndrome clínico, desde la bacteriuria asintomática a la cistitis, pielonefritis y por último la urosepsis, es decir, para la elección de la terapia adecuada y su duración, es probablemente menos importante el conocimiento del lugar anatómico de la infección que la severidad del cuadro clínico del paciente con ITU (13).

La normativa FDA/IDSA distingue al menos cuatro regímenes diferentes para el tratamiento de la ITU, entre los que se debe encuadrar el régimen que se quiera estudiar, ya que cualquier nuevo antimicrobiano debe aprobarse para un uso terapéutico concreto con un determinado régimen de dosificación (11). Los cuatro grupos son:

- a) Régimen terapéutico convencional (7-14 días de tratamiento),
- b) Régimen terapéutico corto (dosis única o dosis múltiples en 1-3 días de tratamiento),
- c) Régimen terapéutico prolongado (4-6 semanas de terapia) y
- d) Régimen profiláctico (dosis bajas administradas a intervalos regulares o en relación a la actividad sexual durante varios meses).

En relación a los estudios antes especificados para el desarrollo general de un fármaco (in vitro, in vivo, clínicos), la normativa FDA/IDSA en el caso concreto de los fármacos para el tratamiento de la ITU, contempla la realización de:

1- Estudios in vitro: Determinación de la actividad frente a uropatógenos, diferenciando dos grandes grupos: a) *Microorganismos causantes de ITU no complicada* y b) *Microorganismos causantes de ITU complicada*.

2- Estudios in vivo. En el caso concreto de las ITU no se requiere la realización de estudios in vivo antes de la realización de ensayos clínicos (11).

3- Ensayos clínicos. Se debe realizar las siguientes evaluaciones (11):

- a) La capacidad del antimicrobiano de erradicar el microorganismo responsable de la infección del tracto urinario,
- b) La capacidad de eliminar los signos y síntomas clínicos de infección, particularmente la piuria,
- c) La capacidad del antimicrobiano de prevenir la reinfección del tracto urinario con bacterias procedentes del reservorio fecal,
- d) Los acontecimientos adversos asociados con el uso del régimen antimicrobiano.

Existe controversia sobre el número de unidades formadoras de colonias (ufc) que deben estar presentes en orina para establecer el diagnóstico de infección. La orina normalmente es estéril, por lo que la presencia de bacterias, hongos o virus en ella implica infección (esté acompañada o no por síntomas clínicos); sin embargo tras el vaciado de la vejiga, la orina debe pasar por la uretra distal y en mujeres a través del perineo, por lo que es fácilmente contaminada por la flora de estas superficies externas (17). Por tanto, la bacteriuria significativa debe definirse como el número de bacterias en orina que distingue con certeza la verdadera bacteriuria de esta contaminación (17). Sin embargo no está claro qué número de bacterias ($> 10^3$ ó $\geq 10^5$ ufc/ml) debe considerarse. La normativa FDA/IDSA considera distintos criterios de inclusión de acuerdo con la entidad clínica a estudiar. Así en la ITU no complicada en mujeres establece el criterio en $\geq 10^3$ ufc/ml, en pielonefritis aguda no complicada y en ITU en varones en $\geq 10^4$ ufc/ml, y en ITU complicada, bacteriuria asintomática e ITU recurrente en $\geq 10^5$ ufc/ml (11). Sin embargo no existe amplio consenso, y autores como Kunin (18) han criticado esta postura y recomiendan que cuando en ensayos clínicos se incluyan pacientes con

recuentos bajos, en el análisis de eficacia se estratifique a los pacientes de acuerdo al número de bacterias presentes en orina separandolos en dos categorías: a) pacientes que presentan recuentos $>10^3$ - $<10^5$ ufc/ml en el cultivo inicial y b) pacientes que presentan recuentos $\geq 10^5$ ufc/ml en el mismo.

La mayoría de mujeres que presentan un proceso agudo con polaquiuria y/o disuria, tienen una infección del tracto urinario con 10^5 o más ufc/ml. Sin embargo, alrededor del 50% tienen menos de 10^5 ufc/ml, y son los llamados síndromes uretrales. Muchos de estos casos son, en realidad, una infección urinaria con títulos bacterianos bajos y presencia de piuria. Excluyendo aquellos casos en que se encuentran bacterias en orina y aquellos en que se demuestra una infección herpética genital o una vaginitis, el resto de casos pueden dividirse en dos grupos: a) aquellos que presentan piuria por uretritis debida a *Chlamydia* o *Neisseria gonorrhoeae* y b) aquellos sin piuria y cultivos negativos (19).

Por tanto, teniendo en cuenta el concepto de síndrome uretral anteriormente descrito, parece lógico que el estudio de un antimicrobiano para cistitis se complete con el estudio de la eficacia del mismo en uretritis producidas por *Chlamydia* o *Neisseria gonorrhoeae* en el campo de las enfermedades de transmisión sexual.

1.3-Desarrollo de un fármaco para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual (ETS).

El término ETS engloba un grupo heterogéneo de síndromes clínicos de muy diferente presentación, causados por distintos microorganismos (bacterias, virus, hongos o parásitos) que presentan sólo en común transmitirse por contacto sexual. Esta heterogeneidad hace obligado el estudio de cada una de las enfermedades por separado. La normativa FDA/IDSA distingue en este campo los capítulos referentes a:

- 1- Tratamiento de Infecciones por Herpes Simplex
- 2- Tratamiento del Chancroide

- 3- Tratamiento de Infecciones vaginales
- 4- Tratamiento de gonorrea no complicada
- 5- Tratamiento de Infecciones por Chlamydia
- 6- Tratamiento de la sífilis

No existe un antimicrobiano eficaz para todas las entidades mencionadas, por lo que debe realizarse un estudio individualizado de cada una de ellas. Sin embargo, aunque se trate de entidades bien diferenciadas, en algunos casos se presentan asociadas, por lo que se debe siempre descartar en un paciente que presente una ETS la presencia concomitante de otra. En este sentido y debido a la frecuencia en que las infecciones por *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia* se presentan de forma concomitante, es importante que, como ocurre con algunas quinolonas, el antimicrobiano utilizado para tratamiento de la infección gonocócica tenga también actividad frente a *Chlamydia* (20). Si consideramos además que, como se ha descrito previamente, estos dos microorganismos son responsables de una parte de los llamados síndromes uretrales, la idoneidad de un antimicrobiano para el tratamiento de cistitis no complicadas se incrementa si presenta eficacia frente a *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia*.

2- PREDICCIÓN DE EFICACIA

2.1- General

Cuando se administra un antimicrobiano para el tratamiento de una infección, el resultado producido en el paciente depende de múltiples variables que modulan la interacción entre las tres partes implicadas en la infección: bacteria, huésped y antimicrobiano. El estudio de esta interacción tridimensional no es posible realizarlo en los tests de laboratorio, sin embargo, la interpretación y relación de los resultados de los distintos tests realizados *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, permitirá realizar una cierta predicción de la eficacia del antimicrobiano.

Los tests clásicos de susceptibilidad *in vitro* proporcionan información sobre la interacción bacteria-antimicrobiano (21), indicando la susceptibilidad de las especies ensayadas a un determinado compuesto mediante un índice numérico (CMI, CMB.); por ello estos tests no deben ser los únicos parámetros a tener en cuenta en la predicción de eficacia, ya que son bidimensionales y no tienen en cuenta la tercera parte implicada, el huésped (21). La farmacocinética de un compuesto proporcionará información sobre las características del antimicrobiano una vez administrado en el huésped, y representan la interacción fármaco - huésped (21). Por último, se puede considerar la determinación de la actividad bactericida del suero como una medida del resultado de la interacción huésped-bacteria (21), aunque el papel del sistema inmunológico es el factor principal del huésped que influencia el resultado de la infección (22), pero es difícil de determinar y simular experimentalmente.

Con respecto a la interacción bacteria - antimicrobiano, los “breakpoints” o puntos de corte de susceptibilidad son un intento de relación de los factores farmacológicos y microbiológicos que se deben considerar en la predicción de eficacia. Se calculan en base a la susceptibilidad de un gran número de aislados de amplia distribución, las propiedades farmacológicas del fármaco y la eficacia clínica obtenida (23). La “British Society for Chemotherapy” establece su determinación a través de la fórmula (5):

$$\text{“Breakpoint” CMI} = (C_{\max} f / t e) \times S$$

donde

C_{\max} es el pico de concentración en sangre de fármaco microbiológicamente activo, conseguido después de la fase inicial de distribución,

f es el factor que representa la unión a proteínas: 1 (<70%), 0,5 (70-90%) y 0,2 (>90%),

t es el factor que representa la semivida: 2 (<1h), 1 (1-3h) y 0,5 (>3h)

e es el número de veces que la C_{\max} debe exceder la CMI.

El resultado de la operación con estos factores se redondea al valor más cercano en la serie de diluciones dobles que incluye 1 µg/ml. El factor S es el deslizamiento necesario para la óptima reproductibilidad.

Estos puntos de corte sirven para categorizar a las cepas como sensibles (cepas que presentan CMI's por debajo del nivel sérico o tisular alcanzado y que causan infecciones susceptibles de ser tratadas con el antimicrobiano en estudio), resistentes (cepas que presentan CMI's que determinan que las infecciones producidas no pueden ser tratadas con el antimicrobiano en cuestión), y moderadamente sensibles (cepas con CMI's intermedias que producen infecciones que pueden ser tratadas con dosis altas del antimicrobiano o con las dosis habituales si la infección se localiza en lugares donde el antimicrobiano esté concentrado) (24). De todas ellas, la categoría resistente es la más predictora, ya que si la infección producida por una cepa resistente es tratada con el antibiotico frente al que la cepa presenta resistencia, la respuesta clínica será presumiblemente de fracaso, mientras que, como hemos descrito antes, la susceptibilidad de la cepa es sólo uno de los muchos factores que influyen en la respuesta a la infección, lo que puede hacer que cepas clasificadas como susceptibles o moderadamente susceptibles no siempre se correlacionen con eficacia clínica (24).

Con respecto a la interacción fármaco-huésped y su relación con la CMI en la predicción de eficacia, se debe considerar la cinética de muerte bacteriana producida por los distintos grupos de antimicrobianos. Clásicamente los antimicrobianos se clasifican en dos grandes categorías según su acción presente dependencia o no de la concentración: fármacos concentración-dependiente versus fármacos concentración-independiente (25). En los fármacos concentración-dependiente como las fluoroquinolonas, la acción del antimicrobiano es mayor con concentraciones alrededor del pico sérico que con concentraciones situadas en el medio de la curva concentración plasmática-tiempo, y esta acción es a su vez mayor que la de concentraciones cercanas a la CMI. Además en estos fármacos es también importante alcanzar altas concentraciones en el pico ya que evita la aparición de resistencias (25). Los antimicrobianos concentración dependiente presentan una tasa de muerte bacteriana que cambia constantemente con la concentración (tiempo

transcurrido) y el número total de bacterias muertas puede considerarse la integral de la tasa de muerte bacteriana concentración-dependiente con respecto al tiempo (25). Por ello este tipo de fármacos presentan una acción ligada al área bajo la curva concentración plasmática-tiempo (AUC) (25), siendo el AUC/CMI el parámetro farmacodinámico más predictor de la eficacia microbiológica, ya que correlaciona la farmacocinética del compuesto (AUC) con la susceptibilidad in vitro (CMI) (26). Además el AUC/CMI al considerar ambos parámetros, permite compensar en parte un parámetro desfavorable (AUC o CMI) con el otro, de manera que dos fármacos con CMI diferentes no presenten diferencias de eficacia, ya que el fármaco con menor potencia presente un parámetro farmacocinético más favorable que compense esas diferencias de susceptibilidad (26).

Con respecto a la medición de la interacción huésped tratado - bacteria, la determinación de la actividad bactericida del suero se ha utilizado frecuentemente para evaluar la posible eficacia de un antimicrobiano in vivo (27) y en algunos casos, su correlación con la eficacia clínica en pacientes. Diversos estudios así realizados han demostrado que títulos bactericidas iguales o superiores a 1:8 son los que se deben considerar adecuados, ya que se correlacionan con eficacia clínica en los estudios realizados (28, 29). La determinación de la actividad bactericida es útil desde el punto de vista clínico, para predecir la resolución de septicemias y otras infecciones, y de gran utilidad en investigación clínica, principalmente en la fase preclínica, para la evaluación de nuevos fármacos (30). En esta línea, Drusano y cols. establecieron un método para predecir la actividad bactericida del suero basado en los niveles séricos alcanzados y la CMB frente al microorganismo infectante, que se formula mediante la expresión $1/2^n$ donde "n" es el número de diluciones que el nivel de antimicrobiano está por encima de la CMB (31).

La determinación de los títulos bactericidas y, por ende, su predicción por parámetros farmacológicos y microbiológicos, debe realizarse en la valoración de cambios de pautas de dosificación (4) tales como el incremento del intervalo entre dosis.

2.2- Predicción de eficacia en Infecciones del Tracto Urinario (ITU)

El objetivo del tratamiento antimicrobiano es la eliminación de la bacteria del tracto urinario, ya que los síntomas desaparecen generalmente sin tratamiento incluso aunque persista la bacteriuria (19). Diversos estudios han evaluado la importancia de la obtención de altos niveles antimicrobianos en suero o en orina para la resolución de la ITU (32-35), habiendo todos ellos demostrado que la desaparición de la bacteriuria se correlaciona directamente con la sensibilidad del microorganismo infectante a la concentración del antimicrobiano alcanzada en orina, siendo ésta por tanto el predictor más fiable de la resolución del proceso, incluso en aquellos casos en que exista afectación renal (34). En el caso de la cistitis no complicada, las bacterias están en la pared de la vejiga o en la orina, y, por tanto, muy expuestas a los antimicrobianos excretados en la orina y con inoculos bacterianos que decrecen intermitentemente con el vaciado de la orina (16). Teniendo en cuenta esto y que las concentraciones de los antimicrobianos en orina frecuentemente superan los niveles séricos, se justifica que el crecimiento bacteriano pueda ser inhibido por antimicrobianos a los que el microorganismo se considera no sensible (16), porque a las dosis empleadas para el tratamiento de la ITU, no alcanzan en suero niveles por encima de la CMI (19). Por ello, si consideramos las categorías de susceptibilidad establecidas por los “breakpoints” o puntos de corte anteriormente definidas, debido a los altos niveles de antimicrobiano alcanzados en orina, la categoría de susceptibilidad “moderadamente sensible” se considera adecuada para la evaluación de fármacos destinados al tratamiento de cistitis no complicadas (5, 23, 36).

La obtención de una actividad antibacteriana alta y sostenida en la orina es el factor más importante para la eficacia (19). Aunque esta actividad antibacteriana viene condicionada fundamentalmente por los niveles en orina del antimicrobiano administrado, también puede verse influenciada por otros factores:

1- Actividad intrínseca de la orina. Uno de los factores más determinantes de esta actividad es el pH urinario, ya que estudios in vitro han demostrado que pH más bajos de 5,0 son generalmente inhibitorios del crecimiento bacteriano (16).

2- Concentraciones subinhibitorias. Las concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos han demostrado in vitro influir en la capacidad de adherencia de las bacterias a las superficies epiteliales para establecer la colonización (37), sin embargo no existen estudios in vivo que demuestren la importancia clínica de esto, aunque existen estudios que demuestran que concentraciones subinhibitorias son responsables de la eliminación de la bacteriuria (38) o son capaces de prevenir la reinfección (39).

3- Metabolitos activos en orina. En ciertas ocasiones los metabolitos excretados en la orina como resultado del metabolismo del compuesto administrado, presentan actividad antibacteriana que contribuye además de la del compuesto original a la actividad antibacteriana de la orina (16).

Paralelamente a lo descrito en relación a los niveles séricos para la predicción de eficacia general, los títulos bactericidas de la orina resultan una medida adecuada de la magnitud de la actividad antibacteriana de la orina, siendo el área bajo la curva de títulos bactericidas (AUBC) un índice sensible del efecto farmacodinámico del fármaco (40). Sin embargo, a diferencia del suero, pocos estudios han investigado esta cuestión y la información de qué títulos deben considerarse óptimos es escasa. En un estudio se observó curación clínica en al menos el 90% de los pacientes que presentaban un título bactericida en orina $\geq 1:4$ (41). Posteriormente en un modelo farmacodinámico in vitro realizado con una quinolona, se demostró que títulos séricos $\geq 1:10$ se correlacionaban con erradicación bacteriana en un periodo de exposición al fármaco de 28 horas (42).

En relación a la necesidad de una actividad sostenida en orina antes mencionada, aunque antibióticos que alcancen altas concentraciones en orina al menos durante 24 horas, pueden utilizarse en dosis única (19), diversos estudios han demostrado que pautas de 3

días son las óptimas ya que mantienen prácticamente las ventajas de la dosis única mejorando la eficacia terapéutica (11, 43).

2.3- Predicción de eficacia en Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS): gonococia

La eficacia de los antimicrobianos para el tratamiento de estas infecciones parece estar ligado a la distribución tisular que presenten. Así, un fármaco con una amplia distribución corporal, particularmente en las mucosas, predice una erradicación del patógeno no sólo en mucosas genitales sino también en los demás sitios donde éste se pueda hallar. Esto es especialmente importante en pacientes con gonococia que pueden presentar infección concomitante rectal o faríngea (44).

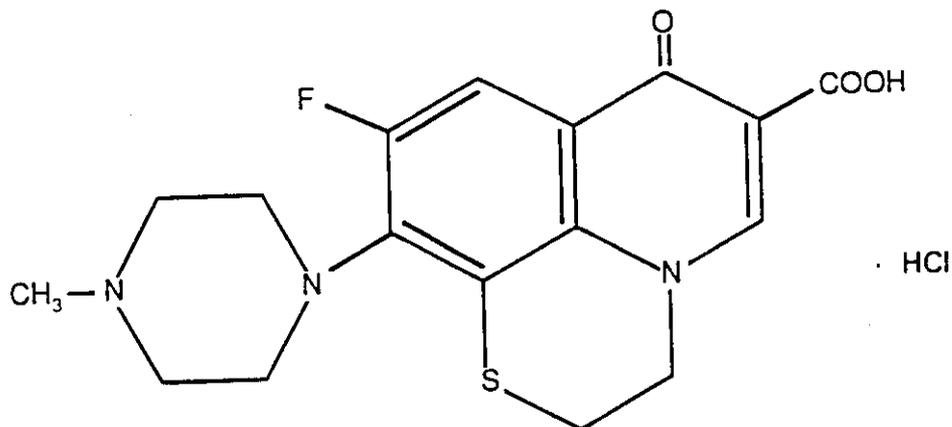
La obtención de índices terapéuticos (C_{max}/CMI) elevados en suero (mayores de 10) parece ser, en el caso de las fluoroquinolonas, el factor determinante de eficacia que no sólo asegura la erradicación de las bacterias infectantes sino que además evita la aparición de cepas mutantes, ya que la experiencia clínica obtenida con quinolonas que presentaban índices menores de 10 frente a *N. gonorrhoeae* ha demostrado una mayor frecuencia de aparición de mutantes resistentes (44). Además, aunque no se ha establecido la importancia de las concentraciones intracelulares del antimicrobiano en la erradicación de la infección, al tratarse de microorganismos que presentan generalmente localización intracelular, parece lógico que los antimicrobianos que alcancen niveles inhibitorios intracelulares representen una ventaja para el tratamiento de estas infecciones (45).

3- INFORMACION PREVIA DE LA QUINOLONA

3.1- Descripción del producto

Rufloxacina es una nueva fluoroquinolona patentada por Mediolanum farmaceutici, Milán, Italia.

Químicamente, rufloxacina es el clorhidrato del ácido 9-fluoro-10-[N-(4-metil)-piperazinil]-7-oxo-2,3-dihidro-7H-pirido-[1,2,3,de] [1,4] benzotiazina -6-carboxílico. Su estructura es:



3.2- Mecanismo de acción

Las quinolonas son agentes antibacterianos que presentan como dianas dos enzimas bacterianas esenciales, la DNA girasa y la DNA topoisomerasa IV. La primera es responsable entre otras funciones, del superenrollamiento negativo del DNA bacteriano, acoplándose como un tetrámero al DNA con dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La topoisomerasa IV también está compuesta por cuatro subunidades, codificadas dos de ellas por el gen *parC* y dos por el *parE*. Esta enzima es responsable de la apertura de la cadena de DNA tras la replicación. Según los esquemas más aceptados las quinolonas formarían un complejo

irreversible quinolona-enzima-DNA, poniendo en marcha una serie de procesos, incluso hoy todavía no completamente conocidos, que desembocarían en la lisis celular. Considerando que ambas enzimas son necesarias para el crecimiento y división celular, resulta lógico que las quinolonas sean agentes bactericidas. En algunas especies como *E. coli* y *N. gonorrhoeae* la diana principal es la girasa mientras que en otras especies como *S. aureus* y *S. pneumoniae* la diana principal es la topoisomerasa IV.

3.3- Estudios microbiológicos

En la Tabla 1 se reflejan comparativamente las CMI de rufloxacina y de otras quinolonas frente a un amplio número de microorganismos gram-positivos y negativos, tomadas de las citas 46-48.

Los resultados de estos estudios *in vitro* demuestran que rufloxacina no es activa frente a patógenos nosocomiales, por lo que se debe desarrollar como fármaco para su utilización en infecciones extra-hospitalarias. Asimismo, a pesar de la actividad frente a *H. influenzae* (CMI₉₀ = 0,5 µg/ml), su pobre actividad frente a *S. pneumoniae* (CMI₉₀ = 64 µg/ml) lo hace inadecuada para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio.

La actividad de rufloxacina frente a uropatógenos y a *N. gonorrhoeae* como principal representante de enfermedades de transmisión sexual susceptibles de ser tratadas con antibióticos, aunque menor que la actividad de las otras quinolonas, parece hacerla adecuada para su investigación en el tratamiento de las mismas teniendo en cuenta las características farmacocinéticas del compuesto.

3.4- Estudios de Fase I

Los estudios de Fase I realizados en voluntarios sanos con dosis única o dosis repetidas, a pesar de la variabilidad inter-estudio, demuestran una buena absorción oral de

rufloxacina, que alcanza niveles máximos de aproximadamente 4 µg/ml en sangre alrededor de 2-4 horas después de la administración de la dosis, con una semivida larga oscilando de 28-36 horas (49-51), buena distribución tisular y niveles mantenidos en sangre.

La determinación de los niveles séricos en un estudio en voluntarios sanos tras dosis única, demostró un pico sérico 4 horas después de la administración oral y picos secundarios 6-12 horas después de la misma, lo que sugirió la existencia de circulación enterohepática (49). Esta circulación enterohepática del compuesto junto con la baja proporción de fármaco libre en tejidos y la alta unión a proteínas séricas, serían los responsables de la larga semivida demostrada por rufloxacina (50).

3.5- Ensayos clínicos

Los ensayos previos realizados en infecciones urinarias se limitaron a un reducido número de pacientes en los que se administraron distintas pautas (52) o se incluyeron pacientes con cistitis no complicada junto con pacientes con cistitis complicada (53), no estando estudiada la dosis única de rufloxacina en patología genitourinaria a pesar de que los datos farmacológicos y microbiológicos previos avalan esta pauta.

OBJETIVOS

1- INTRODUCCIÓN

El propósito del programa de desarrollo de un antimicrobiano es obtener información microbiológica, farmacológica y farmacodinámica, in vitro, in vivo y ex vivo en la fase preclínica, como base para la dosificación y diseño de los ensayos clínicos y, posteriormente en la fase clínica, obtener información con la que poder evaluar la eficacia clínica y seguridad del fármaco, estableciendo las patologías en las que la utilización del antimicrobiano en estudio representa una ventaja respecto al estándar habitualmente utilizado.

Los estudios in vitro e in vivo realizados previamente con rufloxacin demuestran que alcanza altos niveles en orina sin conseguirse niveles efectivos en suero, por lo que su desarrollo terapéutico debe centrarse en el campo de las infecciones genitourinarias.

2- DESARROLLO DE LA QUINOLONA

El programa de desarrollo de rufloxacin se basa en la normativa elaborada por la IDSA/FDA para la evaluación de nuevos agentes antiinfecciosos. Los estudios realizados completarán la información previa existente, investigarán la predicción de eficacia y sentarán las bases farmacobiológicas de su utilización terapéutica.

Para la realización de los ensayos clínicos se seguirá las Normas de Buena Práctica Clínica (norma internacional de calidad científica y ética dirigida al diseño, realización, registro y redacción de informes de ensayos que implican la participación de sujetos humanos), de forma que se asegure la protección de los derechos, la seguridad de los pacientes y la credibilidad de los datos obtenidos.

En base a los estudios microbiológicos previos, el desarrollo inicial se centrará en las infecciones urinarias no complicadas así como en el tratamiento de la infección uretral producida por *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia* como enfermedades de transmisión sexual.

3- OBJETIVOS GENERALES

El objetivo de la tesis es describir el diseño y los resultados de los estudios realizados para el programa de desarrollo de una quinolona -rufloxacina- en infecciones urinarias no complicadas y para el tratamiento de la infección gonocócica y por Chlamydia, interrelacionando la actividad bactericida in vitro y ex vivo con la actividad determinada in vivo, para estudiar la predicción de eficacia pre-ensayo y la consecución de la misma.

Este objetivo se concreta en tres puntos:

- 1.- Realizar los estudios in vitro y los ensayos clínicos que de acuerdo con la normativa FDA/IDSA se requieren para la evaluación de un fármaco para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas, infección gonocócica y por Chlamydia.
- 2.- Establecer la pauta de dosificación que deberá utilizarse en los ensayos clínicos a realizar en las distintas patologías, en base a los resultados in vitro y ex vivo obtenidos.
- 3.- Evaluar la predicción de eficacia a partir de los datos farmacodinámicos teóricos y experimentales en la respuesta terapéutica alcanzada en los ensayos clínicos realizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1- Diseño y coordinación de los estudios.

La Tabla 2 muestra un resumen de los estudios, ensayos clínicos, autores y referencias bibliográficas que ha dado lugar el programa de desarrollo. Realizamos el diseño de los protocolos, cuadernos de recogida de datos, monitorización de los estudios, explotación de los datos y la elaboración de los informes finales y publicaciones en el Departamento de Investigación Clínica de SmithKline Beecham Pharmaceuticals.

El primer estudio del programa se inició en 1992 y el último ensayo clínico finalizó en enero de 1996.

2- Estudios in vitro

2.1- Actividad in vitro de rufloxacina frente a *E. coli* (54, 55).

El estudio fue diseñado para determinar la actividad in vitro de rufloxacina comparada con la de ácido nalidíxico, ofloxacina, norfloxacina, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico y gentamicina frente a 350 cepas de *Escherichia coli* procedentes de orinas de pacientes extrahospitalarios con infección del tracto urinario, recogidas entre 1988 y 1992. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de difusión en agar Mueller-Hinton (Difco, Detroit, Mi. USA) siguiendo métodos estándar (70). El inóculo empleado fue 10^5 ufc/ml y las concentraciones utilizadas fueron las comprendidas en el rango de 0,003 a 128 $\mu\text{g/ml}$. Se definió la CMI como la menor concentración de antimicrobiano que inhibía el crecimiento bacteriano tras 18-24 horas de incubación.

2.2- Cinética de muerte bacteriana de rufloxacina frente a *E. coli* (54).

Se realizaron curvas de muerte bacteriana utilizando un aislado clínico de *E. coli* ($CMI_{\text{rufloxacina}} = 0,5 \mu\text{g/ml}$) y las siguientes concentraciones de rufloxacina: 0,25, 0,5, 1,25, 2,50 y 5 $\mu\text{g/ml}$. El inóculo, obtenido por dilución de un cultivo de 18-24 horas de incubación en caldo Mueller-Hinton a 37°C, fue de 10^7 ufc/ml. La cinética de muerte bacteriana se determinó durante 7 horas a 37°C en baño de agitación, realizándose recuentos bacterianos en placas con agar Mueller-Hinton a cada hora hasta completar el periodo de 7 horas.

2.3- Efecto post-antibiótico de rufloxacina frente a *E. coli* (54, 55).

Para el estudio del efecto post-antibiótico de rufloxacina, se expuso un cultivo puro en fase logarítmica de crecimiento, en medio Mueller-Hinton, del aislado clínico de *E. coli* utilizado en el estudio de la cinética de muerte bacteriana, con un inóculo de aproximadamente 10^7 ufc/ml, a concentraciones de rufloxacina iguales a 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 veces la CMI. Después de una hora de exposición, el antimicrobiano se eliminó por dilución 1/1000 en medio Mueller-Hinton. Se realizaron contajes bacterianos con un intervalo de 1 hora durante 8 horas. El efecto postantibiótico se midió como la diferencia entre los cultivos tratados y controles del tiempo necesario para que la población bacteriana se incrementara en $1 \log_{10}$ después de la eliminación del antimicrobiano del medio. Se consideró significativo un efecto postantibiótico ≥ 30 minutos.

2.4- Susceptibilidad de las cepas aisladas en la orina de las pacientes incluidas en el ensayo Fase III en ITU (68)

La toma de muestra para cultivo se realizó siguiendo la rutina habitual en envases estériles a la llegada de las pacientes a las visitas reseñadas en el punto 3.2. Las CMI de rufloxacina y norfloxacina frente a los uropatógenos aislados se determinaron mediante series de diluciones progresivas (de 0,03 a 16 $\mu\text{g/ml}$) en medio sólido (Mueller-Hinton). Las cepas se congelaron a

-20°C hasta el día del ensayo. Este día se prepararon subcultivos en medio líquido TSB (Trypticase-Soy Broth, bioMérieux, France) y se incubaron a 37°C durante una noche. Los cultivos se diluyeron con suero fisiológico estéril hasta el N°1 de la escala de McFarland y con un replicador de Steers, se inocularon 2 µl al medio sólido (inóculo final estimado 10⁵ UFC/ml). Las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 18-20 horas. Se consideró como CMI aquella concentración de antimicrobiano que presentaba macroscopicamente inhibición del crecimiento con respecto al control.

2.5- Determinaciones microbiológicas del ensayo Fase III en uretritis gonocócicas: Aislamiento e identificación de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* en los exudados uretrales. Serología de sífilis.

La toma de las muestras en las visitas reseñadas en el punto 3.3 se realizó siguiendo la rutina habitual por medio de torundas de Dacron (71). Tras obtenerse la muestra, la siembra se realizó en el medio de cultivo de Thayer-Martin modificado, New York City, o Martin Lewis (72) directamente al lado del paciente. El medio una vez sembrado, se incubó directamente en estufa a 37°C o se transportó en atmósfera de CO₂ hasta el laboratorio. En caso de no sembrarse directamente la muestra se utilizó un medio de transporte no nutritivo, como son los medios tamponados de Stuart y Amies; sembrándose la muestra antes de transcurridas 5 horas.

El medio una vez sembrado se incubó al 5% de CO₂ a 37°C en ambiente húmedo (70 %) durante 72 horas. Sólo si transcurrido este período de tiempo no había crecido *N. gonorrhoeae* se descartó esta infección. Otros tests que no fueran el cultivo (v.gr. Tinción de Gram o la identificación inmunoquímica de los antígenos del gonococo o sondas de ADN), podían utilizarse para el diagnóstico de presunción, antes de incluir al paciente, pero no como métodos diagnósticos requeridos por el protocolo para la inclusión del paciente.

La detección de *Chlamydia trachomatis* en la muestra uretral, podía realizarse utilizando los siguientes métodos de laboratorio: inmunofluorescencia, ELISA o PCR. La serología de sífilis se realizó por medio de TPHA (Treponema pallidum haemagglutination inhibition), FTAabs

(Fluorescent treponemal antibody absorption test), RPR (Rapid Plasma Reagin) y/o VDRL (Venereal disease research laboratory) según la rutina de cada centro.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas se congelaron en tubos de TSB + glicerol (que habían sido almacenados en nevera a 4°C) y se mantuvieron en el congelador (a -20°C durante un máximo de 30 días) hasta la fecha de su envío al Laboratorio de Referencia de Neiserias del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda (Instituto de Salud Carlos III) para la determinación de susceptibilidad y serotipo. En el caso de que las cepas se enviaran sin congelar se procedía de la siguiente manera: una vez que el gonococo había sido aislado en el medio de cultivo (Thayer Martin o en cualquiera de sus modificaciones-New York City, Martin Lewis...-), se replicaba a placa agar chocolate y se incubaba a 24°C durante 24 horas máximo, enviándose directamente la placa al Centro Nacional de Microbiología por mensajero urgente (< 24 horas).

2.6- Determinación de susceptibilidad y serotipación de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* en el Centro Nacional de Microbiología (69)

Los aislamientos clínicos procedentes tanto de las muestras pre-tratamiento como post-tratamiento, en el caso de fracaso microbiológico, enviadas por los distintos centros, se resembraron en medio GC suplementado y se incubaron 18-24 horas a 37°C con 5% de CO₂. La confirmación de que se trataba de cepas de *N. gonorrhoeae* se realizó mediante inoculación en medio cystine-tryptic digest agar (CTA) con azúcares. Se determinó la producción de β-lactamasa utilizando bastoncillos de identificación (Oxoid, Basingstoke, UK) y la CMI de penicilina, espectinomicina, tetraciclina, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, norfloxacina y rufloxacina mediante el método de dilución en agar (70), utilizando como cepas patrón *N. gonorrhoeae* de la OMS: WHO-A, WHO-B, WHO-C, WHO-D y WHO-E.

La caracterización de las cepas se realizó por su auxotipo mediante crecimiento en medios químicamente definidos (73) y por su serovariedad mediante aglutinación con un panel de

anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epitopos de la proteína I de la membrana del gonococo (74).

2.7- Detección de mutaciones en los aislamientos de *N. gonorrhoeae* (69)

Considerando que los mecanismos de resistencia a quinolonas más frecuentemente descritos son las mutaciones radicadas en el gen *gyrA* (DNA girasa) (75) y las mutaciones localizadas en el gen *parC* (Topoisomerasa IV) (76), en aquellos casos en que se demostrara fracaso microbiológico del tratamiento aplicado y un cambio de susceptibilidad del aislado, se realizó un estudio de los aislados consecutivos de cada paciente para determinar si se había producido resistencia in vivo. Para ello se realizó una amplificación mediante cebadores específicos, utilizando la técnica de PCR, de las regiones concretas de los genes anteriormente citados en las que se han descrito mutaciones implicadas en la adquisición de resistencia a quinolonas. Dichos productos de PCR fueron recuperados de geles de agarosa, para evitar la posible interferencia de productos de ampliación inespecíficos, y sometidos a secuenciación automática. Para efectuar la citada secuenciación y a efecto de evitar la posibilidad de artefactos, se procedió a llevarla a cabo en ambas direcciones.

3- Ensayos clínicos

3.1- Ensayo clínico de Fase I (56-66).

El ensayo fue diseñado cruzado, randomizado y controlado con norfloxacin, con la administración de dosis únicas de 400 mg de rufloxacin y norfloxacin por vía oral a doce voluntarios sanos. Previamente a su inclusión en el ensayo los voluntarios, tras recibir información detallada sobre los objetivos y procedimientos del ensayo, otorgaron su consentimiento informado por escrito. El ensayo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol y por el Ministerio de Sanidad.

El plan experimental se dividió en dos periodos de 72 horas (con extensión hasta las 168 horas para la recogida de muestras de heces) que comprendían la toma única de los dos fármacos en estudio, separados por un periodo de lavado entre ambos de 14 días debido a la larga semivida de rufloxacina previamente descrita (51), de acuerdo con la lista de randomización que establecía el orden de administración de los dos fármacos para cada uno de los doce voluntarios. Estos ingresaron durante 24 horas en la Unidad de Ensayos Clínicos en cada una de las dos fases del ensayo. Se realizó una exploración física, analítica de sangre (hematimetría y bioquímica sanguínea) y orina y un electrocardiograma antes de la primera administración y 7 días después de cada una para establecer la seguridad de los compuestos.

En cada periodo, se administró el fármaco correspondiente con 150 ml de agua y se tomaron muestras de sangre, orina y heces para realizar un estudio del perfil farmacocinético y las determinaciones microbiológicas ex vivo especificadas más adelante. Las muestras de sangre se tomaron antes de la administración (basal) y 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después de ésta; las muestras de orina se recogieron antes de la administración y a los intervalos: : 0-2, 2-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-24, 24-36, 36-48, 48-60 y 60-72 horas, mientras que las muestras de heces fueron recogidas antes de la administración y 48 y 72 horas después de ésta.

3.2- Ensayo clínico de Fase III en infecciones urinarias (67, 68).

El ensayo fue diseñado randomizado, paralelo y controlado con norfloxacin comparando dos regímenes: 400 mg de rufloxacin en dosis única versus 400 mg/12 h de norfloxacin durante 3 días. El estudio fue aprobado por el Comité Etico de Investigación Clínica de la Fundación Puigvert de Barcelona y por el Ministerio de Sanidad. Los pacientes candidatos de inclusión en el estudio eran mujeres de edades comprendidas entre 18 y 55 años de edad, diagnosticadas de cistitis no complicada: cultivo de orina con $> 10^3$ ufc/ml de un uropatógeno (enterobacterias, enterococo o *Staphylococcus saprophyticus*) y signos o síntomas de cistitis no complicada (disuria y/o polaquiuria y/o nicturia y/o fiebre $< 38^{\circ}\text{C}$ y/o dolor suprapúbico). Las pacientes que presentaran test de embarazo positivo, valores de creatinina > 2 mg/l, GOT > 35 U/l, GPT > 55 U/l, fiebre $> 37,5^{\circ}\text{C}$, síntomas durante más de 5 días o historia de 3 o más episodios de

infección urinaria en los 12 últimos meses, fueron excluidas del ensayo. Antes de la administración del tratamiento, se tomó una muestra de orina para cultivo y determinación de susceptibilidad *in vitro* de la bacteria aislada, así como para realizar una analítica de orina basal. En caso de ausencia de aislamiento (con independencia de los criterios clínicos de exclusión) la paciente era excluida de la evaluación clínica y microbiológica.

Debido a la larga semivida de rufloxacina previamente descrita (51), y a fin de evitar que en algún caso la presencia de niveles terapéuticos de la quinolona en la orina enmascarara la presencia de bacterias en la misma, se realizaron dos visitas de seguimiento a todas las pacientes como evaluación temprana de eficacia y seguridad: una visita 3-7 días después de la administración de la dosis y otra 8-12 días después de la misma. Los resultados de la evaluación clínica temprana o a corto plazo son, por tanto, la suma de los resultados obtenidos en cada una de estas dos visitas. En la visita de selección, se instruyó a las pacientes para la recogida de una muestra de orina de 12 horas para medición de niveles antibióticos y actividad antibacteriana de la orina frente al aislado inicial de cada paciente, hasta obtener 50 muestras de orina de 12 horas. Con este fin, se proporcionó a cada paciente un envase de 2 litros para recogida estéril de orina y una tarjeta diario donde se especificaba en cada caso la hora de inicio y fin de la toma de muestra. El intervalo especificado correspondía en cada caso al intervalo 72-84 horas del inicio de la toma de medicación, esto es, se iniciaba la recogida de muestra 72 horas después de la única toma de Rufloxacina y 12 horas después de la última dosis de Norfloxacin; en ambos casos por tanto, aproximadamente 3 semividas después de la última dosis. La paciente debía llevar la muestra de orina en la primera visita de seguimiento, manteniéndola en nevera hasta dicho momento y en los periodos entre colección de orina.

En aquellas pacientes que presentaron curación microbiológica en la evaluación temprana, se realizó de acuerdo con la Normativa de la FDA (11), una visita de seguimiento a largo plazo que se programó 4-6 semanas después del inicio del tratamiento. En todas las visitas de seguimiento se realizó una evaluación clínica (evaluación de signos y síntomas) y de seguridad (acontecimientos adversos comunicados por las pacientes espontáneamente o en la anamnesis así como analítica de orina de seguimiento a los 3-7 días) y se tomó una muestra de orina para cultivo. Los criterios de evaluación fueron los siguientes:

Evaluación clínica: Satisfactoria (desaparición de todos los síntomas y signos de infección), Insatisfactoria (presencia de alguno de los mismos) y Recaída (tras la desaparición de todos los síntomas y signos de infección, reaparición de los mismos en cualquiera de los controles realizados en la fase de seguimiento) (11).

Evaluación microbiológica: Erradicación (desaparición en los cultivos control de los microorganismos aislados en el cultivo pre-tratamiento), Fracaso (persistencia en el primer cultivo control de los microorganismos aislados en el cultivo pre-tratamiento), Reinfección (aparición en los cultivos control de microorganismos distintos de los aislados en el cultivo pre-tratamiento) y Recaída (reaparición de los mismos microorganismos del cultivo inicial en un cultivo control con la negatividad de uno previo) (11).

3.3- Ensayo clínico de Fase III en uretritis gonocócica (69)

De acuerdo con las Normas IDSA/FDA, en los ensayos clínicos para la evaluación de la eficacia de un fármaco en uretritis gonocócica en varones, en los que el fármaco en estudio debe demostrar un porcentaje de eficacia $> 95\%$, se permite la utilización de control histórico como comparativo y se debe incluir 150 pacientes en el estudio (20). Por tanto, este ensayo fue diseñado con control histórico (77, 78), realizándose la elección de los estudios de acuerdo con los siguientes criterios: a) ensayos realizados en nuestro país, b) ensayos realizados con un fármaco del mismo grupo del que se evaluaba (quinolonas) y c) ensayos en los que se utilizaba una dosis única y se obtenía un porcentaje de eficacia $> 95\%$. El estudio, que debía incluir 150 pacientes, fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario San Carlos de Madrid y por el Ministerio de Sanidad.

Los pacientes incluidos recibían una dosis única de 400 mg de rufloxacin con un período de seguimiento de 14 días debido a la larga semivida del compuesto (51). Se realizaron dos visitas de seguimiento, la primera a los 4-7 días de acuerdo con la Normativa FDA/IDSA (20) y la segunda (que se programó en este estudio debido a las características farmacocinéticas del

fármaco) a los 11-14 días. Los pacientes eran incluidos si presentaban evidencia clínica de uretritis gonocócica (periodo de incubación de 2-6 días, supuración amarillenta espesa y disuria) y no presentaban infección complicada o tratamiento previo. Previo a la toma del fármaco se tomaban muestras de uretra para cultivo (dos hisopos: uno para la tinción de Gram y otro para cultivo de *N. gonorrhoeae* y para detección de *C trachomatis*) y muestras de ano y faringe si la historia del paciente indicaba exposición (20). Además se tomaba una muestra de sangre para serología de sífilis.

La variable principal de valoración de eficacia fue la erradicación de *N. gonorrhoeae* en la muestra uretral, siendo sólo valorados para eficacia aquellos pacientes que presentaran aislamiento (crecimiento en cultivo de *N. gonorrhoeae*) en la muestra uretral inicial. También se evaluaron la ausencia de evidencia de infección por *N. gonorrhoeae* en las muestras faríngeas y rectales (en caso de coexistir tal infección), la ausencia de evidencia de infección por clamidia (en caso de coexistir), y la posibilidad de que existiera una uretritis postgonocócica en la tercera visita.

4- Estudios ex vivo

4.1- Determinación de niveles de antimicrobiano

4.1.1.-Niveles séricos (Ensayo clínico Fase I) (56, 57, 61)

Los niveles de rufloxacina y norfloxacina se determinaron por bioensayo utilizando como cepa patrón *E. coli* ISF 432 para rufloxacina (CMI = 0,5 µg/ml) y *E. coli* ATCC 25922 (CMI = 0,125 µg/ml) para norfloxacina. Se utilizaron placas con Agar Antibiotico N° 1 (Difco) que se inocularon con las cepas, siendo el inóculo final de 5×10^6 ufc/ml. En cada placa se practicaron pocillos de 10 mm de diámetro en los que se depositó 60 µl de cada muestra o de cada una de las concentraciones de la curva patrón (estándar) según el caso, incubándose posteriormente las placas a 37°C durante 18 horas. La curva patrón se realizó en una mezcla de suero libre de antibiótico de los propios voluntarios antes de la administración del fármaco, con

concentraciones antibióticas finales de 0,25 µg/ml a 10 µg/ml. El estudio de las muestras y del estándar se realizó por duplicado.

Se utilizó el programa Microstat (Ecosoft, Inc., Indianapolis, Ind.) para determinar la línea de regresión (curva patrón) y extrapolar las concentraciones antibióticas séricas a partir de los halos de inhibición obtenidos. La reproductibilidad entre días fue del 3, 6 y 6% para las concentraciones de 0,62, 2,5 y 5 µg/ml respectivamente para rufloxacina y 2, 4, y 8% para las concentraciones de 0,5, 1,7 y 2,3 µg/ml respectivamente para norfloxacin. Los límites de detección fueron 0,5 µg/ml para rufloxacina y 0,12 µg/ml para norfloxacin.

4.1.2.-Niveles en orina

4.1.2.1- Ensayo clínico Fase I (56, 61, 63)

La determinación de niveles en orina se realizó según lo descrito en la determinación sérica de niveles, utilizando las siguientes concentraciones: 400, 200, 100, 50 y 25 µg/ml para norfloxacin y 100, 50, 25, 10 y 5 µg/ml para rufloxacin como curva patrón en una mezcla de orina de los propios voluntarios antes de recibir el tratamiento. La reproductibilidad entre días fue del 4, 5 y 10% para las concentraciones de 1,5, 6,25 y 50 µg/ml respectivamente para rufloxacin y 8, 8, y 12% para las concentraciones de 25, 100 y 400 µg/ml respectivamente para norfloxacin. Los límites de detección fueron 1,25 µg/ml para rufloxacin y 0,5 µg/ml para norfloxacin.

4.1.2.2- Ensayo clínico Fase III en ITU (67, 68)

En la primera visita de seguimiento, se recogieron los envases de aquellas pacientes que traían la muestra de orina de 12 horas recogida en el intervalo 72-84 horas, que correspondía al intervalo iniciado 72 horas después de la dosis única de rufloxacin o 12 horas después de la última toma de norfloxacin. Se midió el volumen de orina y una alícuota de 5 ml de la misma

se guardó a -20°C hasta el día de la determinación. Los niveles respectivos de rufloxacina y norfloxacina se determinaron por bioensayo. Se usó como cepa patrón *E. coli* ATCC 25922 ($\text{CMI}_{\text{RUF}} = 0,25 \mu\text{g/ml}$; $\text{CMI}_{\text{NOR}} = < 0,06 \mu\text{g/ml}$). Los tests se realizaron por duplicado en día diferente y se sembró en masa en medio sólido (Agar Antibiotico N° 3, Difco) usando como escala de referencia una serie de 0,25 a 16 $\mu\text{g/ml}$ de rufloxacina o norfloxacina según el caso. Se utilizaron placas con base de cristal y marco metálico (14 x 25 cms), pocillos de 8 mm de diámetro y 100 μl de muestra. Los halos de inhibición se midieron con un calibrador de precisión digital ($\pm 0,01 \text{ mm}$) y se trasladaron a un papel semilogarítmico para su extrapolación respecto a los patrones. Sólo se admitieron como validas rectas de regresión con un coeficiente de correlación $> 0,9$. Las muestras que mostraron diámetros por encima del patrón máximo fueron diluidas adecuadamente. Los límites de detección fueron 2,5 $\mu\text{g/ml}$ para rufloxacina, y 0,6 $\mu\text{g/ml}$ para norfloxacina.

4.1.3.-Niveles en heces (Ensayo clínico Fase I) (65, 66)

La toma de muestra de las heces se realizó mediante evacuación espontánea sobre una talla desechable esteril. Los envases estériles vacíos donde se debía posteriormente recoger la muestra se pesaron previamente anotándose su peso individual. Inmediatamente después de la emisión de las heces, se ubicaron en el interior de dos recipientes una porción de éstas, procurando seleccionar aquellas partes que no hubieran estado en contacto con la talla. Una vez en los envases, se pesaron para conocer su peso exacto y se enviaron al laboratorio para su análisis.

La determinación de los niveles de rufloxacina y norfloxacina en las heces de los voluntarios se realizó mediante técnicas descritas previamente (79) utilizando los sobrenadantes obtenidos. Para ello se utilizaron placas Petri que contenían 22 ml de agar TSB y 0,5 ml de una suspensión de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 ($\text{CMI}_{\text{NOR}} = 0,03 \mu\text{g/ml}$, $\text{CMI}_{\text{RUF}} = 0,12 \mu\text{g/ml}$) incubada en 10 ml de caldo de trypticase-soja durante 18 horas. Se utilizó un estándar de rufloxacina y norfloxacina con las siguientes concentraciones: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$. En cada placa se practicaron diversos pocillos de 4 mm de diámetro en los que se

depositó 0,02 ml de la muestra o del estándar. Los sobrenadantes se ensayaron directamente o diluidos 1/2, 1/4 y 1/8. Tanto el estudio de la muestra como del estándar se realizó por triplicado. Después de la incubación a 37°C se midieron los halos de inhibición alrededor de los pocillos y se realizaron los cálculos necesarios para determinar la concentración de ambos antibióticos en las heces. Los límites de detección fueron 0,5 µg/ml para norfloxacin y 1 µg/ml para rufloxacin. La reproductibilidad fue 2,9%, 6,5% y 4% para rufloxacin y 2,2%, 7,1% y 4,7% para norfloxacin con concentraciones de 1, 16 y 128 µg/ml.

4.2.-Actividad bactericida sérica y en orina

4.2.1.-Actividad bactericida sérica (Ensayo clínico Fase I) (57, 61)

La determinación del Título Bactericida Sérico se realizó frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 utilizando la técnica de microdilución. Las muestras de suero de cada voluntario se diluyeron en suero no inactivado obtenido de cada voluntario antes de la administración del fármaco y conteniendo un 20% de caldo Isosensitest (Oxoid). El volumen final en cada pocillo fue de 100 µl y el inóculo final de 10⁵ ufc/ml. Las placas una vez inoculadas se incubaron a 37°C durante 18 horas, realizándose subcultivos en agar Mueller-Hinton libre de antibiótico (Difco) que se incubaron a 37°C durante 18 h. Se definió Título Bactericida como la mayor dilución del suero que producía una reducción del 99,9% del inóculo inicial.

4.2.2.-Actividad antibacteriana en orina

4.2.2.1- Ensayo clínico Fase I (59, 61-63)

La determinación del Título Bactericida en orina se realizó según el método descrito para la actividad bactericida sérica, frente a las mismas cepas, utilizando la orina de cada voluntario recogida antes de la administración del fármaco y con un 20% de caldo Isosensitest para diluir

la muestra. Se definió Título Bactericida como la mayor dilución de la orina que producía una reducción del 99,9% del inóculo inicial.

4.2.2.2- Ensayo clínico Fase III en ITU

En la primera visita de seguimiento, se recogieron los envases de aquellas pacientes que traían la muestra de orina de 12 horas recogida en el intervalo 72-84 horas, que correspondía al intervalo iniciado 72 horas después de la dosis única de rifloxacina o 12 horas después de la última toma de norfloxacina. Se midió el volumen de orina y una alícuota de 5ml de la misma se guardó a -20°C hasta el día del ensayo. Se determinó el poder bacteriostático y bactericida de la orina según la técnica de microdilución descrita por Zeiler et al. (80) utilizando un medio compuesto por 20% de caldo Isosensitest y 80% de orina pre-tratamiento de la propia paciente en cada caso, con un inóculo final de 10^5 ufc/ml de la cepa original de la propia paciente. Las placas de microdilución inoculadas se incubaron a 37°C durante 20 horas con subcultivos posteriores en agar chocolate libre de antibiótico a 37°C durante 20 horas. Se definió como Poder Bacteriostático la dilución máxima que a las 20 horas de su inoculación presentaba macroscópicamente inhibición del crecimiento respecto al control. Se definió Poder Bactericida como la dilución máxima que en un pase posterior en agar-chocolate mostrara a las 20 horas ausencia de crecimiento o 99,9% de disminución respecto al control.

4.3.-Curvas de letalidad en orina (Ensayo clínico Fase I) (61, 64)

Se realizaron curvas de muerte bacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 con la orina de 6 voluntarios seleccionados al azar, escogiéndose las muestras de orina recogidas a los tiempos 0-2, 8-12 y 60-72 horas tras la administración de cada uno de los dos fármacos del estudio. Se utilizó una modificación del método empleado por Krogstad et al. (81) con un volumen de muestra de 2 ml al que se le añadió un mismo volumen de caldo Isosensitest. Las mezclas se homogeneizaron en tubos estériles de poliestireno de 25 ml, a los que se añadieron 400 µl de un cultivo de *E. coli* en fase logarítmica de crecimiento, resultando un inóculo final de 10^7 ufc/ml. Todos los tubos se incubaron a 37°C en baño con agitación durante el tiempo que duró

el ensayo. Se tomaron alícuotas para realizar contajes bacterianos a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 h. del inicio de la incubación, realizándose las diluciones decimales adecuadas en solución salina estéril para el cómputo de bacterias viables. Se añadieron las alícuotas de 20 μ l de cada dilución a placas conteniendo agar Isosensitest, que se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por placa como medida de las bacterias viables por mililitro a cada tiempo. Para determinar el porcentaje de reducción del inóculo inicial, se utilizó la expresión: $[100 - (100 \text{ inoculo}_{xt} / \text{inóculo}_{0h})]$.

4.4.-Efecto sobre la flora fecal (Ensayo clínico Fase I) (65, 66)

Este estudio se realizó en las muestras de heces obtenidas según se describe en el punto 4.1.3. Para realizar el estudio cuantitativo de la flora fecal de cada voluntario, se homogeneizó 1g de heces con 9 ml de extracto de levadura al 0,05% y se efectuaron diluciones sucesivas en el mismo medio hasta la dilución 10^{10} . De cada dilución se sembró 0,1 ml en diferentes medios de cultivo para aislar las bacterias aerobias, anaerobias facultativas, anaerobias estrictas y levaduras más frecuentes en las heces. Los medios de cultivo fueron: Agar MacConkey, agar sangre más ácido nalidixico, medio de Chapman-manitol, medio Sabouraud más cloranfenicol, medio de Rogosa, agar sangre anaerobio CDC y agar Schaedler K-V con 5% de sangre de carnero. Para la detección de bacterias esporuladas (*Clostridium* spp.) se retiró antes de efectuar la siembra, una alícuota de 1 ml, se mezcló con la misma cantidad de etanol al 95% y se mantuvo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de su inoculación, las placas se incubaron a 35-37 °C en atmósfera aerobia y anaerobia entre 1 y 7 días en función de los organismos buscados. Una vez efectuado el recuento de colonias, la identificación de los microorganismos aislados se realizó según métodos convencionales. El límite inferior de detección del método fue de 10^2 ufc/g de heces. Se calculó la reducción de los recuentos bacterianos con respecto a basal (muestra pre-tratamiento) mediante la expresión: $100 - (100 \text{ UFC}_t / \text{UFC}_b)$, donde UFC_t es el recuento de colonias a un tiempo determinado y UFC_b es el recuento de colonias basal. Se estableció un punto de corte para evaluar y comparar la reducción obtenida en cada grupo, eligiéndose una reducción $> 70\%$ del inóculo inicial por ser la menor reducción de *E. coli* en los sujetos que presentaban mayores contajes en la muestra

basal, lo que ocurrió en el sujeto nº 1 con rufloxacina ($> 10^8$ ufc/g en la muestra basal y 71,11% reducción a las 168 h).

5- Predicción de eficacia (59, 60, 62)

Con los parámetros farmacocinéticos y microbiológicos obtenidos en el estudio Fase I se realizó una predicción de la actividad antibacteriana de la orina, para comprobar posteriormente si ésta se correlacionaba con la obtenida experimentalmente en el mismo ensayo y, de esta forma, poder sentar las bases de la dosificación (dosis, intervalo de dosificación y duración del tratamiento) del ensayo posterior en ITU no complicada.

Los títulos bactericidas teóricos en orina se calcularon en base a la expresión $1/2^n$ donde n es el número de diluciones que el nivel de antimicrobiano está por encima de la CMB (31). Se calculó el área bajo la curva de títulos bactericidas versus tiempo (AUBC) con los datos determinados experimentalmente y con aquellos obtenidos tras aplicar la expresión anteriormente mencionada (teóricos). Al considerar los títulos bactericidas experimentales y teóricos obtenidos, y debido a que la orina corresponde siempre a un intervalo de tiempo (en este caso los intervalos de tiempo indicados en el punto 3.1) y no a un punto como en el caso del suero, se calculó el AUBC considerando como puntos en el eje de abcisas (tiempo) los valores de los tiempos medios de cada intervalo de recogida de orina (59, 62).

6- Análisis farmacocinético

Las concentraciones plasmáticas de rufloxacina y norfloxacina determinadas en el estudio de Fase I se ajustaron a un modelo cinético abierto monocompartimental utilizando el programa MK model (82). El análisis farmacocinético de los resultados del estudio se realizó mediante el programa PKCALC (83), y se realizó asumiendo una completa biodisponibilidad de ambos fármacos, ya que no existen datos sobre su administración parenteral al tratarse de dos quinolonas para administración exclusiva vía oral.

Para la determinación de las AUBCs se utilizó la regla trapezoidal y el programa PKCALC (83).

7- Análisis estadístico

7.1- Estudio de Fase I

La comparación de los títulos bactericidas de rufloxacina versus norfloxacina en suero y orina se realizó por análisis de la varianza de doble vía (tratamiento y fase del ensayo) para medidas repetidas. Para determinar en las curvas de muerte bacteriana con la orina el porcentaje de reducción del inóculo inicial, se utilizó la expresión: $[100 - (100 \text{ inoculo}_{xh}/\text{inóculo}_{0h})]$. La comparación de porcentajes de reducción se realizó por análisis de la varianza de doble vía para series repetidas y por el test de la *t* de Student.

La reducción de ufc/g de heces en las muestras tomadas post-tratamiento respecto a la muestra basal se calculó mediante la expresión: $100 - (100 \text{ UFC}_t/\text{UFC}_b)$ donde UFC_t = ufc/g de heces a los distintos tiempos post-tratamiento y UFC_b = ufc/g de heces de la muestra basal.

Las comparaciones intergrupo de niveles de antimicrobiano en las muestras de heces y de las reducciones medias de los recuentos bacterianos a los distintos tiempos, se realizó por análisis de la varianza de doble vía para series repetidas y por el test de la *t* de Student. Las comparaciones intragrupo del número de sujetos que presentaban una reducción de contajes bacterianos > 70% a cada tiempo respecto a los valores basales, se realizaron por el test exacto de Fisher.

7.2- Estudio de Fase III en ITU

Tamaño de la muestra: Se calculó en base al porcentaje de éxito (96%) obtenido con el fármaco control en un estudio previo (84), y un valor delta del 10% para demostrar que no existían diferencias entre los tratamientos (hipótesis nula). El valor de los errores tipo I y II fue 0,05 y 0,2 respectivamente. El número total de pacientes a incluir resultó 122 (61 pacientes por tratamiento). El tamaño muestral se incrementó a 150 pacientes evaluables siguiendo la Normativa IDSA/FDA para la evaluación clínica de antimicrobianos (11).

Análisis estadístico: Las comparaciones entre grupos se realizaron con el test de chi cuadrado y el test exacto de Fisher para parámetros cualitativos, y el test de Mann-Whitney y la correlación de Spearman para parámetros cuantitativos. Se consideró estadísticamente significativo valores de $P < 0,05$ con dos colas.

7.3- Predicción de eficacia (Títulos en orina experimentales versus títulos teóricos)

El análisis estadístico se realizó con el test de Wilcoxon para comparar datos pareados. Se consideró un nivel de significación de 0,001 para comparaciones múltiples aplicando la corrección de Bonferroni a fin de asegurar un nivel de significación global de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1- Resultados microbiológicos

1.1- Actividad in vitro de rufloxacin frente a *E. coli* (54, 55).

La tabla 3 muestra los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antimicrobianos ensayados frente a los 350 aislados de *E. coli*. Las fluoroquinolonas y gentamicina demostraron ser los compuestos más activos. La actividad antibacteriana de rufloxacin fue inferior a la de norfloxacin, ofloxacin y gentamicina pero superior a la de ac. nalidixico y penicilinas, siendo *E. coli* inhibido en el 90% de los casos con una concentración de rufloxacin de 4 µg/ml.

1.2- Cinética de muerte bacteriana de rufloxacin frente a *E. coli* (54).

La Figura 1 muestra la curva de letalidad bacteriana obtenida con las distintas concentraciones de rufloxacin. A concentraciones suprainhibitorias, rufloxacin demostró ser rápidamente bactericida frente a *E. coli*. Tras 2h de exposición a una concentración 10 veces la CMI, se produjo una reducción del 99,9% en términos de unidades formadoras de colonias (ufc), mientras que esta misma reducción se obtuvo tras 3h cuando la concentración de rufloxacin fue igual a la CMI.

1.3- Efecto post-antibiotico de rufloxacin frente a *E. coli* (54, 55)

La Figura 2 muestra el efecto post-antibiotico de rufloxacin frente a *E. coli*, oscilando éste entre 2 y 3 horas con las concentraciones de 1 a 10 veces la CMI y siendo dependiente de la concentración de rufloxacin ensayada.

1.4- Susceptibilidad de las cepas aisladas en la orina de las pacientes incluidas en el ensayo Fase III en ITU (68).

La tabla 4 muestra los microorganismos aislados y la CMI₅₀ y CMI₉₀ de rufloxacina y norfloxacina frente a ellos. Como se ha descrito en la introducción para las cistitis no complicadas, *E.coli* fue el microorganismo más frecuentemente aislado, representando un 80% del total de aislados. Comparando la susceptibilidad in vitro de los aislados, norfloxacina demostró ser aproximadamente 8 veces más activa que rufloxacina.

1.5- Susceptibilidad de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* y serotipación de los mismos (69).

El Laboratorio de Referencia de Neisserias del Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda recibió 8 cepas de *N. gonorrhoeae* procedentes de dos de los centros participantes y aisladas en un total de seis pacientes. Las cepas fueron caracterizadas y su susceptibilidad antimicrobiana determinada, siendo los resultados obtenidos los expresados en la Tabla 5.

Como se puede observar, seis aislados correspondían a la muestra inicial pre-tratamiento y dos a la muestra de seguimiento, habiéndose demostrado en estos dos últimos casos el fracaso microbiológico del tratamiento. Además, como demostró la determinación de susceptibilidad de los aislados, se produjo un desarrollo de resistencia in vitro puesto que los aislados iniciales y finales presentaron CMIs iguales para penicilina, espectinomicina, cefoxitina y ceftriaxona (0,5, 8, 2 y 0,001 µg/ml respectivamente) pero sin embargo las CMIs de tetraciclina y de las fluoroquinolonas ensayadas aumentaron en la misma proporción, en los dos casos, en los aislados de las muestras de seguimiento, pasando de 1 a 4 µg/ml para tetraciclina, de 0,003 a > 0,12 µg/ml para ciprofloxacina, de 0,03 a 2 µg/ml para norfloxacina y de 0,25 a 8 µg/ml para rufloxacina.

1.6- Mutaciones en los aislamientos de *N. gonorrhoeae* (69)

Los mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas se estudiaron en dos pacientes (pacientes nº 1 y 5 de la Tabla 5) que presentaron fracaso clínico y microbiológico, estudiando 2 aislamientos sucesivos de estos dos pacientes. El resultado del estudio realizado fue que ninguno de los cuatro aislados presentaba mutación alguna en el gen *parC*. Tampoco se observó mutaciones en el gen *gyrA* de los dos aislados en las muestras pre-tratamiento; sin embargo, los aislados de las muestras de seguimiento presentaban una mutación en este gen: en un paciente el Asp95 del gen *gyrA* mutaba a Asn, mientras que en el otro paciente, la Ser91 mutaba a Phe.

2- Resultados farmacológicos

2.1- Niveles séricos (Ensayo clínico Fase I) (56, 57, 61)

La Tabla 6 muestra los niveles de rufloxacin y norfloxacin en suero. Los niveles de ambas quinolonas estaban por debajo del límite de detección en las muestras de suero obtenidas antes de la administración de la dosis. Los niveles séricos de rufloxacin fueron significativamente ($P < 0,001$) mayores que los de norfloxacin en todos los tiempos de determinación, siendo además detectables en el 83% de los voluntarios hasta 72h después de la administración de la dosis, contrariamente a lo que ocurrió con norfloxacin cuyos niveles sólo fueron detectables en el 30% de los voluntarios a las 12h de la administración de la dosis.

2.2- Niveles en orina

2.2.1- Ensayo clínico Fase I (56, 61, 63)

La Tabla 7 muestra los niveles de rufloxacin y norfloxacin en orina. Los niveles de ambas quinolonas estaban por debajo del límite de detección en las muestras de orina obtenidas antes de la administración de la dosis. Los niveles de norfloxacin fueron mayores en las primeras muestras post-dosis, siendo la diferencia entre niveles estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en los intervalos 0-2, 2-4 y 4-8 h. En el intervalo 8-12 h los niveles mantenidos de rufloxacin son ya superiores a los de norfloxacin, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) desde las 12 h hasta las 72h.

2.2.2- Ensayo clínico Fase III en ITU (67, 68)

Treinta y cinco pacientes que presentaron cultivo positivo en la muestra de orina pre-tratamiento aportaron la orina recogida en el intervalo 72-84h, lo que representa un 22,4% del total de pacientes incluidas, correspondiendo 16 pacientes al grupo tratado con rufloxacin y 19 al tratado con norfloxacin. Los niveles urinarios determinados fueron (mediana): 26,5 $\mu\text{g/ml}$ (rango 0,3-160) para norfloxacin y 24,75 $\mu\text{g/ml}$ (rango 12,5-52) para rufloxacin.

De las 35 pacientes, 26 pacientes presentaron *E. coli* como microorganismo responsable de la infección. Considerando sólo este subgrupo de muestras, los niveles urinarios fueron (mediana): 24,75 $\mu\text{g/ml}$ para las dos quinolonas, con un rango de 12,5 a 52 $\mu\text{g/ml}$ para rufloxacin y de 3,15 a 160 $\mu\text{g/ml}$ para norfloxacin.

2.3- Niveles en heces (Ensayo clínico Fase I) (65, 66)

La Tabla 8 muestra los niveles de norfloxacin y rufloxacin determinados en heces. En dos voluntarios incluidos en el grupo de norfloxacin no se pudo obtener una muestra basal de heces, por que se excluyeron para el análisis de esta muestra, quedando los resultados en el grupo de norfloxacin reducidos a los datos obtenidos en 10 voluntarios de los 12 incluidos. La concentración de norfloxacin en la muestras tomadas a las 48 h fue superior a la de rufloxacin, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$). En las muestras tomadas a las 72h, ambos antimicrobianos presentaron concentraciones similares; sin embargo, 168h después de la administración de la dosis, 9 voluntarios presentaron niveles de rufloxacin, mientras que en sólo 1 voluntario se detectaron niveles de norfloxacin, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

2.4 Análisis farmacocinético de los datos obtenidos en el ensayo clínico Fase I. (56-62)

La Tabla 9 muestra los parámetros farmacocinéticos de rufloxacin y norfloxacin en suero y orina. La absorción de norfloxacin fue más rápida de la de rufloxacin, con T_{max} (tiempo que se tarda en alcanzar la concentración máxima en suero) de 2h vs. 3,5h. Rufloxacin mostró una C_{max} (concentración máxima del fármaco en suero) más de 4 veces superior a la de norfloxacin y un AUC (área bajo la curva concentración plasmática-tiempo) aproximadamente 40 veces superior al de esta última. Asimismo los resultados obtenidos confirman los datos previamente disponibles que describían una larga semivida de rufloxacin, quedando determinada en este estudio en 28h.

3- Resultados farmacodinámicos

3.1- Curvas de letalidad en orina (Ensayo clínico Fase I) (61, 64).

La tasa de muerte bacteriana obtenida con la orina de 6 voluntarios incluidos en el ensayo frente a *E. coli* ATCC 25922 se muestra en la Tabla 10. Se obtuvo una tasa de muerte superior al 87% con la orina recogida en los intervalos 0-2 y 8-12 h para norfloxacin y rufloxacin a los distintos tiempos de incubación (1 a 4h), siendo la reducción del inóculo inicial del 99,9% aproximadamente tras 4 h de incubación en todos los grupos. En el grupo de norfloxacin se observa que la reducción del inóculo inicial obtenida con las muestras del intervalo 8-12h es estadísticamente ($P < 0,05$) superior a la obtenida con las muestras del intervalo 0-2h que presentaba niveles más altos de la quinolona. La reducción de aproximadamente el 99,9% se mantuvo con rufloxacin en la orina recogida en el intervalo 60-72h, pero no con norfloxacin, ya que los niveles de ésta estaban por debajo del límite de detección en la orina de los 6 voluntarios.

3.2- Actividad bactericida sérica (Ensayo clínico Fase I) (57, 61)

La CMI y CMB modal frente a *E. coli* ATCC 25922 fue 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ para rufloxacin y 0,125 y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ para norfloxacin mientras que para *S. aureus* ATCC 29213, los valores fueron 4 y 4 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente para rufloxacin y 0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente para norfloxacin. La Tabla 11 muestra los títulos bactericidas séricos de rufloxacin y norfloxacin a los distintos tiempos frente a estas dos cepas y las áreas bajo curva de actividad bactericida sérica (AUBC). En las muestras tomadas antes de la administración del antimicrobiano, los títulos bactericidas eran inferiores a 2. Rufloxacin presentó unos títulos bactericidas superiores a norfloxacin a lo largo de todo el tiempo de medición, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) frente a *E. coli* a las 8, 12, 24 y 48h, y frente a *S. aureus* a las 4, 6, 8, 12 y 24h ($P < 0,05$). El AUBC frente a *E. coli* fue 5,8 veces superior para rufloxacin y 5,6 veces superior frente a *S. aureus* para esta misma quinolona.

3.3- Actividad bactericida en orina

3.3.1- Ensayo clínico Fase I (59, 61-63)

La Tabla 12 muestra los títulos bactericidas en orina de rufloxacina y norfloxacina a los distintos tiempos frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. En las muestras tomadas antes de la administración del antimicrobiano, los títulos bactericidas eran inferiores a 2. Análogamente a lo descrito con los niveles, los títulos bactericidas de norfloxacina son superiores en los intervalos tempranos, siendo la diferencia estadísticamente significativa, para luego ir progresivamente decayendo, invirtiéndose los resultados y mostrando rufloxacina títulos bactericidas significativamente superiores en las muestras tomadas a partir de aproximadamente las 12h. Concretamente frente a *E. coli* las diferencias significativas para norfloxacina se encuentran en los intervalos 0-2, 2-4, y 4-8h ($P < 0,05$), mientras que son significativamente superiores los títulos de rufloxacina a partir de las 16 horas. Frente a *S. aureus*, no se encuentran diferencias significativas a tiempos cortos, siéndolo ($P < 0,05$) a partir de las 16 horas por mantener rufloxacina los títulos bactericidas iniciales e ir disminuyendo los títulos de norfloxacina.

3.3.2- Ensayo clínico Fase III en ITU

Los resultados obtenidos se han analizado (análogamente a lo realizado con los niveles) en el grupo de 35 pacientes (19 con norfloxacina y 16 con rufloxacina) que aportaron la orina de 12h para análisis y en el subgrupo de las 26 pacientes (12 con norfloxacina y 14 con rufloxacina) que presentaron como microorganismo infectante *E. coli*. La Tabla 13 muestra los títulos bactericidas de ambos tratamientos, los títulos bacteriostáticos y los cocientes inhibitorios determinados en el subgrupo de 26 pacientes. No se encontró diferencias significativas entre los resultados determinados considerando un grupo y otro. Comparando el grupo de norfloxacina con el de rufloxacina, norfloxacina mostró

unos títulos aproximadamente una dilución superior a los de rufloxacina, sin embargo, los cocientes inhibitorios de norfloxacin fueron aproximadamente 8 veces superiores a los de rufloxacin, demostrandose una correlación estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre los cocientes inhibitorios y los títulos bacteriostáticos determinados. Teniendo en cuenta los valores de niveles determinados en orina, se deduce que las diferencias en cocientes inhibitorios se debe a las diferencias de CMI frente a los aislados iniciales.

3.4- Estudio del efecto sobre la flora fecal

Como ya se mencionó en el punto referente a los niveles de antimicrobiano determinados en heces, dos voluntarios del grupo de norfloxacin fueron excluidos por falta de muestra inicial, por lo que los resultados de este grupo están tomados de 10 voluntarios en vez de 12. Las Tablas 14 y 15 muestran las unidades formadoras de colonias por gramo de heces (ufc/g) de *E. coli* y *B. fragilis*, respectivamente, determinadas en cada voluntario antes de la toma del antimicrobiano (muestra basal) y el porcentaje de descenso a los distintos tiempos respecto a la muestra basal. La Tabla 16 muestra el porcentaje de voluntarios que presentaron descenso bacteriano $> 70\%$ y el descenso medio obtenido en dichos sujetos a los distintos tiempos.

Con respecto a *E. coli*, todos los voluntarios tras tomar norfloxacin presentaron descenso de ufc/g 48h después de la administración de la dosis, siendo el descenso $> 70\%$ en todos los casos, mientras que se produjo descenso en 11 de los 12 voluntarios tras tomar rufloxacin, siendo el descenso $> 70\%$ en 10 de ellos. Sin embargo 168h después de la administración, el porcentaje de descenso $> 70\%$ con rufloxacin se mantuvo en 10 voluntarios, mientras que sólo 4 voluntarios presentaron descenso $> 70\%$ a este tiempo después de la toma de norfloxacin, hallandose con esta última quinolona un diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el porcentaje de sujetos con descenso a las 48 h y 72 h respecto al porcentaje de sujetos con descenso a las 168h.

Con respecto a *B fragilis*, 9 de 10 voluntarios (90%) mostraron a las 48h una reducción después de la administración de norfloxacin, aunque en sólo dos casos (20%), la reducción fue >70%. Tras la administración de rufloxacin, 10 voluntarios (83,3%) mostraron reducción de ufc/g, que fue >70% en 6 casos (50%). A las 168h, se produjo una reducción >70% en dos voluntarios con rufloxacin y en uno con norfloxacin. En ningún caso las diferencias de porcentajes de descenso determinados a los distintos tiempos de toma de muestra fueron significativas.

Durante todo el periodo estudiado, el recuento de anaerobios (*Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Lactobacillus* spp), estreptococos y enterococos se mantuvo dentro de los valores de normalidad, sin variaciones significativas en ambos grupos. Por otra parte, tampoco se objetivó sobrecrecimiento valorable de levaduras ni otros microorganismos.

4- Resultados de la predicción de eficacia (títulos bactericidas teóricos versus experimentales) (59, 60, 62)

La Tablas 17 y 18 muestran los títulos bactericidas teóricos y experimentales en orina de rufloxacin y norfloxacin a los distintos tiempos frente a *E. coli* y *S. aureus* respectivamente y las respectivas áreas bajo la curva de títulos bactericidas (AUBC). Los títulos bactericidas experimentales son aquellos que se expresaron en la Tabla 12 cuando se describió la actividad bactericida en orina determinada en el ensayo clínico Fase I, pero se han incluido también en las Tablas 17 y 18 para facilitar la comparación con los títulos teóricos determinados. En las Tablas 17 y 18 se ha incluido también la razón título experimental/teórico a los distintos tiempos así como la misma razón para las AUBCs.

Los títulos experimentales de rufloxacin fueron significativamente ($P < 0,001$) más altos que los teóricos determinados desde las 2h hasta las 48h frente a *E. coli*. Sin embargo no lo fueron con norfloxacin a ningún tiempo ni frente a ninguna de las dos cepas ensayadas, ni con rufloxacin frente a *S. aureus* (excepto en el intervalo 2-4h donde sí hubo diferencias significativas por ser mayores los títulos experimentales). Las AUBCs

experimentales frente a las dos cepas fueron significativamente superiores a las teóricas con rufloxacina pero no con norfloxacina. Considerando la razón título experimental/teórico, la actividad ex vivo experimental de rufloxacina siempre superó a la teórica frente a las dos cepas ensayadas, mientras que con norfloxacina, la razón fue ≤ 1 , lo que indica que la actividad experimental nunca fue superior a la teóricamente determinada. Este aumento de la actividad experimental frente a la teórica con rufloxacina fue estadísticamente ($P < 0,001$) mayor que el determinado con norfloxacina frente a *E. coli* pero no frente a *S. aureus*.

5- Resultados clínicos

5.1- Ensayo clínico Fase I (56-62)

Se incluyeron 12 varones sanos con las siguientes características antropométricas medias (media \pm desviación estándar): edad $24,1 \pm 2,7$ años, peso $70,9 \pm 7,4$ kg y talla $174,9 \pm 6,7$ cm. Rufloxacina y norfloxacina fueron bien tolerados por los voluntarios sin que se produjeran cambios significativos en los parámetros clínicos y analíticos estudiados. Tres voluntarios presentaron un acontecimiento adverso que fue en los tres casos considerado leve, dos tras la administración de norfloxacina (elevación de SGPT y abdominalgia) y el otro tras la administración de rufloxacina (sensación de distensión abdominal). En el primer caso la relación causal con el fármaco se consideró “no relacionado” y en los otros dos casos “probablemente no relacionado”.

5.2- Ensayo clínico Fase III en ITU (67, 68)

Se incluyó en el estudio un total de 203 mujeres con las siguientes características medias \pm desviación estándar de edad y peso: $31,5 \pm 10,6$ años y 57 ± 7 Kg. La distribución aleatoria de las pacientes por tratamiento fue de 100 pacientes en el grupo de norfloxacina y 103 en el grupo de rufloxacina. No se encontraron diferencias

significativas entre las características demográficas de ambos grupos. De estas 203 pacientes, 47 pacientes fueron excluidas del análisis de eficacia, 32 pacientes debido a violación de protocolo (falta de cumplimiento con la medicación o las visitas programadas, presencia de más de un microorganismo en la muestra de orina inicial, infección concomitante o presencia de otra patología) y 15 pacientes debido a presentar cultivo negativo de la muestra pre-tratamiento. Por tanto, 203 pacientes se consideraron evaluables para seguridad y 156 para eficacia: 74 pacientes del grupo de norfloxacin y 82 del grupo de rufloxacin.

Evaluación microbiológica

En la evaluación temprana o a corto plazo, un 94% (77 de 82) de las pacientes que habían tomado rufloxacin presentaron erradicación microbiológica del microorganismo infectante frente a un 99% (73 de 74) de las pacientes incluidas en el grupo de norfloxacin, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento. El único fracaso microbiológico en el grupo de norfloxacin se debió a un *S. saprophyticus* con una CMI de 2 µg/ml a norfloxacin y, que en realidad se trataba de una recaída ya que se aisló el microorganismo en el cultivo realizado en la visita de 8-12 días tras haber sido negativo el cultivo de esta paciente realizado en la visita a los 3-7 días. En el grupo de rufloxacin, 5 pacientes fueron evaluadas como fracaso microbiológico, en 4 casos el microorganismo infectante fue *E. coli* (CMI de 0,5 µg/ml en dos aislados, y de 2 µg/ml y > 16 µg/ml en los dos restantes) y en un caso se debió a *K. pneumoniae* (CMI de 2 µg/ml). El aislamiento de *E. coli* con CMI > 16 µg/ml fue el único que se realizó en la visita realizada a los 3-7 días tras la administración de rufloxacin.

Un 79% (119 de 150) de las pacientes con erradicación microbiológica fueron evaluadas en la evaluación a largo plazo realizada 4-6 semanas después de la administración del fármaco. Rufloxacin y norfloxacin presentaron una tasa de recaídas similar: 5% con rufloxacin (3 pacientes de 64) y 4% con norfloxacin (2 pacientes de 54). Las recaídas fueron siempre debidas a cepas de *E. coli* susceptibles a los dos antimicrobianos en

estudio: en el caso de rufloxacina la CMI fue 0,25 µg/ml en un caso y 0,5 µg/ml en dos, y en el caso de norfloxacina, la CMI fue < 0,06 µg/ml para las dos cepas aisladas.

Evaluación clínica

En la evaluación temprana o a corto plazo, se evaluaron como fracaso clínico 5 de las 82 pacientes con rufloxacina y 3 de las 74 pacientes con norfloxacina, lo que representa un 6,1% y un 4% respectivamente. El fracaso microbiológico anteriormente descrito con norfloxacina fue uno de estos fracasos clínicos. En el grupo de rufloxacina, 3 fracasos clínicos fueron también fracasos microbiológicos, mientras que los otros dos fracasos clínicos presentaron erradicación bacteriana. Dos de los fracasos microbiológicos anteriormente comentados se produjeron en pacientes asintomáticas.

En la evaluación a largo plazo, se consideró fracaso clínico 5 de 64 pacientes (8%) con rufloxacina y 4 de 54 pacientes (7%) con norfloxacina. En este último grupo, dos pacientes presentaron recaídas tanto desde el punto de vista microbiológico como clínico, mientras que los otros dos casos correspondieron solo a fracasos clínicos (uno de ellos ya evaluado como fracaso clínico en la primera visita). En el grupo de rufloxacina, dos casos fueron recaídas clínicas y microbiológicas y tres casos recaídas clínicas, mientras que una de las pacientes que presentó recaída microbiológica no presentaba síntomas y por tanto se evaluó como curación clínica.

Si analizamos globalmente los resultados obtenidos y considerando el criterio que debe prevalecer en la evaluación de esta patología de acuerdo con la Normativa IDSA/FDA (11), que establece que en ausencia de bacterias en la orina, la evaluación final de las pacientes con ITU no complicada debe ser curación, incluso en aquellos casos en que persistan los síntomas (es decir, la evaluación microbiológica es considerada más relevante que la clínica), podemos afirmar que en este estudio, con los dos tratamientos aplicados, al menos un 94% de las pacientes evaluables presentaron curación en la visita a corto plazo y en la visita a largo plazo, al menos el mismo porcentaje de pacientes con curación en la primera visita que acudieron a la segunda visita de seguimiento.

Si se considera el número de bacterias aisladas en cultivo, un 71% de las pacientes (112 de 156) presentaron $> 10^5$ ufc/ml. No se encontraron diferencias significativas de eficacia en la evaluación microbiológica entre el grupo de pacientes que presentaron recuentos mayores de 10^3 ufc/ml y menores de 10^5 ufc/ml en el cultivo inicial y aquellas que presentaron recuentos mayores de 10^5 ufc/ml.

Evaluación de seguridad

No se encontraron diferencias significativas en la incidencia de acontecimientos adversos entre los dos grupos de tratamiento. Veintiuna de las 103 pacientes tratadas con rufloxacina presentaron 39 acontecimientos adversos, lo que representa un 20,4% de pacientes. En 15 de estos 39 casos (38%), el acontecimiento estaba relacionado con el sistema nervioso central y se produjeron en 12 pacientes, siendo los más comunes vértigo (6 casos), insomnio (3 casos) y ansiedad (3 casos). Doce de los 39 acontecimientos (31%) fueron gastrointestinales y ocurrieron en 9 pacientes (7 pacientes con náusea o vómitos y 3 pacientes con dolor o molestias abdominales). Todos los acontecimientos fueron leves y de ≤ 24 h de duración, excepto una paciente que presentó diarrea y ansiedad durante 48 h.

Entre las 100 pacientes que tomaron norfloxacina, 12 pacientes (12%) presentaron 16 acontecimientos adversos que fueron en 14 casos (14 de 16; 89%) reacciones gastrointestinales (9 pacientes con náusea/ vómitos). Todos los acontecimientos fueron leves y de ≤ 24 h de duración, excepto un caso de náusea y otro de diarrea ocurridos tras la ingesta de cada una de las dosis de norfloxacina. No se produjo ningún acontecimiento relacionado con el sistema nervioso central en este grupo. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P= 0,001$) al comparar el número de pacientes con acontecimientos adversos relacionados con el sistema nervioso central entre ambos grupos de tratamiento (11,7% con rufloxacina versus 0% con norfloxacina).

5.3- Ensayo clínico Fase III en uretritis gonocócica (69)

El estudio fue cancelado por falta de eficacia de rufloxacina tras la inclusión en el ensayo de 9 pacientes, ya que considerando que el porcentaje de éxitos debía ser $\geq 95\%$ y los resultados obtenidos en estos 9 pacientes hacían difícil conseguir este porcentaje, se estimó que no era éticamente correcto continuar el ensayo en vista de que otros fármacos, como ceftriaxona, presentan porcentajes de eficacia del 98% (20).

De los 9 pacientes a los que se les administró el fármaco, 7 fueron incluidos para la evaluación por presentar *N. gonorrhoeae* en el cultivo inicial. De éstos, un paciente no volvió a la visita de control, por lo que 6 pacientes se completaron para evaluación. El 50% de ellos (3 pacientes) presentaron fracaso clínico ya que persistían los síntomas y signos de infección en la visita de control. En uno de ellos no se pudo realizar evaluación microbiológica por negarse a la toma de muestra post-tratamiento y en los dos pacientes restantes (en ambos casos, pacientes homosexuales, de 33 años de edad, y VIH positivos), se confirmó el fracaso microbiológico como se ha descrito previamente.

Con respecto a *C. trachomatis* y *T. pallidum*, en ninguno de los pacientes incluidos en el estudio se objetivó infección concomitante en la muestra inicial.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Actividad bacteriostatica in vitro de rufloxacina y otras quinolonas frente a microorganismos gram-positivos y gram-negativos.

Microorganismo	Antibiotico	MIC₉₀ (µg/ml)	Rango
E. coli	Rufloxacina	4	(0,25 - >128)
	Norfloxacina	2	(<0,03 - 8)
	Ciprofloxacina	0,5	(<0,03 - 1)
	Ofloxacina	1	(<0,03 - 4)
	Pefloxacina	2	(0,06 - 32)
Staph. spp.MS	Rufloxacina	2	(0,5 - 4)
	Norfloxacina	2	(0,5 - 4)
	Ciprofloxacina	0,25	(0,06 - 0,5)
	Ofloxacina	1	(0,12 - 2)
	Pefloxacina	1	(0,5 - 4)
Staph. spp.MR	Rufloxacina	8	(0,5 - 128)
	Norfloxacina	16	(0,5 - 128)
	Ciprofloxacina	1	(0,06 - 1)
	Ofloxacina	4	(0,25 - 16)
	Pefloxacina	8	(0,5 - 16)
Proteus (indol-negativo)	Rufloxacina	1	(0,25 - 4)
	Norfloxacina	1	(<0,03 - 1)
	Ciprofloxacina	-	
	Ofloxacina	0,5	(<0,03 - 2)
	Pefloxacina	-	
S. pneumoniae	Rufloxacina	64	(2 - 128)
	Norfloxacina	32	(1 - 64)
	Ciprofloxacina	2	(0,25 - 2)
	Ofloxacina	16	(0,5 - 8)
	Pefloxacina	32	(1 - 32)

Tabla 1 (continuación)

H. influenzae	Rufloxacina	0,5	(0,06 - 0,5)
	Norfloxacina	0,12	(<0,03 - 0,12)
	Ciprofloxacina	<0,03	(<0,03)
	Ofloxacina	0,06	(<0,03 - 0,06)
	Pefloxacina	<0,03	(<0,03)
M. catarrhalis	Rufloxacina	2	(1 - 2)
	Norfloxacina	1	(0,5 - 1)
	Ciprofloxacina	0,06	(<0,03 - 0,12)
	Ofloxacina	1	(0,25 - 1)
	Pefloxacina	1	(0,5 - 1)
P. aeruginosa	Rufloxacina	64	(8 - 64)
	Norfloxacina	16	(1 - 16)
	Ciprofloxacina	-	
	Ofloxacina	16	(1 - 16)
	Pefloxacina	-	
A. lwoffii	Rufloxacina	> 128	(2 - > 128)
	Norfloxacina	64	(2 - 64)
	Ciprofloxacina	1	(0,06 - 4)
	Ofloxacina	16	(0,5 - 16)
	Pefloxacina	64	(2 - 64)
N. gonorrhoeae	Rufloxacina	0,5	(0,06 - 0,5)
	Norfloxacina	0,06	(<0,03 - 0,12)
	Ciprofloxacina	< 0,03	(<0,03)
	Ofloxacina	0,06	(< 0,03 - 0,06)
	Pefloxacina	0,06	(< 0,03 - 0,06)

Tomado de las citas bibliográficas 46 (Mattina R, Cocuzza CE, Cesana M, Bonfiglio G, 1991), 47 (Ravizzola G, Pinsi G, Piralì F, Colombrita D, Foresti I, Peroni L, Turano A, 1989) y 48 (Segre G, Cerretani D, Cerri D, Moltoni L, 1988).

TABLA 2. Resumen de los estudios y ensayos clínicos realizados

CENTRO	ESTUDIO	REFERENCIA	INVESTIGADORES/AUTORES*
Departamento de Microbiología Facultad de Medicina Universidad Complutense Madrid	1. Actividad frente a uropatógenos 2. Curvas de muerte bacteriana frente a E. coli 3. Efecto post-antibiotico frente a E. coli.	54, 55	M. L. Gómez-Lus, S. Barrientos, J.M. Rubias, S. Heredia, J. Prieto M.J. Giménez
Servicio de Farmacología Clínica Hospital Universitario Germans Trias i Pujol Badalona (Barcelona)	4. Ensayo clínico Fase I 4.1. Estudio farmacocinético y farmacodinámico 4.2. Seguridad y tolerancia		P. Salvá, J. Costa, C. Vedia, J. A. García-Vicente, J. Montero I. P. Balcabao, M. Martín, J. Prieto
Departamento de Microbiología Facultad de Medicina Universidad Complutense Madrid	4.3. Niveles séricos y urinarios 4.4. Actividad bactericida sérica y urinaria 4.5. Curvas de muerte bacteriana de la orina frente a E. coli	56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66	M.T. Jiménez de Anta, F. Marco, M.A. Marcos, J. Gómez L. Aguilar, M.J. Giménez, R. Dal-Ré
Servicio de Microbiología Hospital Clinic i Provincial Barcelona	4.6 Niveles en heces 4.7. Estudio de alteración de flora fecal.		
Servicio de Nefrología y Urología Fundació Puigvert Barcelona	5. Ensayo clínico Fase III en ITU 5.1. Eficacia clínica 5.2. Seguridad	67, 68	G.Del Río, J. Caffaratti
Servicio de Microbiología Fundació Puigvert Barcelona	5.3. Susceptibilidad de los aislados 5.4. Niveles en orina 5.5. Actividad bacteriostática y bactericida de la orina		F. Dalet L. Aguilar, M. J. Giménez, R. Dal-Ré.

* de acuerdo con "Uniform requirements for publication in biomedical journals. BMJ 1991; 302: 338-341.

TABLA 2 (Continuación)

CENTRO	ESTUDIO	REFERENCIA	INVESTIGADORES/AUTORES*
Servicio de Dermatología y ETS Hospital Universitario San Carlos Madrid	6. Ensayo clínico Fase III en uretritis gonocócicas 6.1. Eficacia clínica 6.2. Seguridad	69	L. Olmos J. Ballesteros, J. A. Vázquez
Centro Sanitario Sandoval Madrid			J. Vila, F. Marco
Laboratorio de Neisserias Centro Nacional de Microbiología Majadahonda (Madrid)	6.3 Susceptibilidad de los aislados 6.4 Serotipación de los aislados		M. J. Giménez, L. Aguilar
Servicio de Microbiología Hospital Clinic i Provincial Barcelona	6.5 Estudio de mutaciones		

Diseño y Coordinación de los estudios

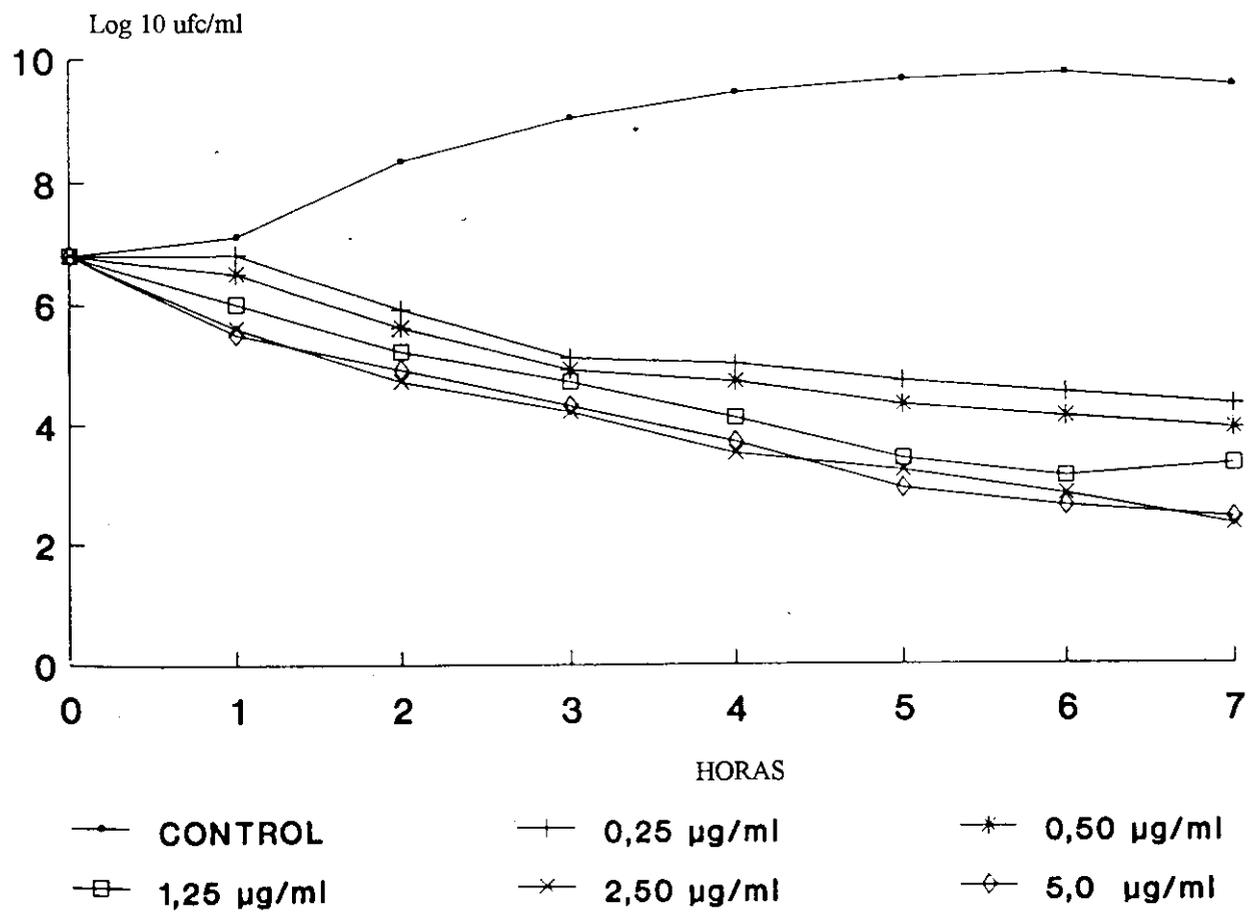
Departamento de Investigación Clínica. SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Madrid.	Dr. L. Aguilar M.J. Giménez Dr. R. Dal-Ré	Diseño de protocolos y cuadernos de recogida de datos Monitorización de estudios Explotación de datos Elaboración de informes finales	Referencias 54 a 69
--	---	---	---------------------

Tabla 3. Susceptibilidad in vitro de 350 aislamientos extrahospitalarios de *Escherichia coli* procedentes de pacientes con infección del tracto urinario (ITU)

<u>ANTIMICROBIANO</u>	<u>CMI₅₀</u>	<u>CMI₉₀</u>	<u>RANGO</u>
Ac. nalidixico	4	128	2-128
Ofloxacino	0,12	0,5	0,06-128
Norfloxacino	0,25	0,5	0,06-128
Rufloxacino	0,5	4	0,25-64
Amoxicilina	128	128	128-128
Amoxicilina + Ac. clavulánico	8	16	0,06-32
Gentamicina	0,5	2	0,25-16

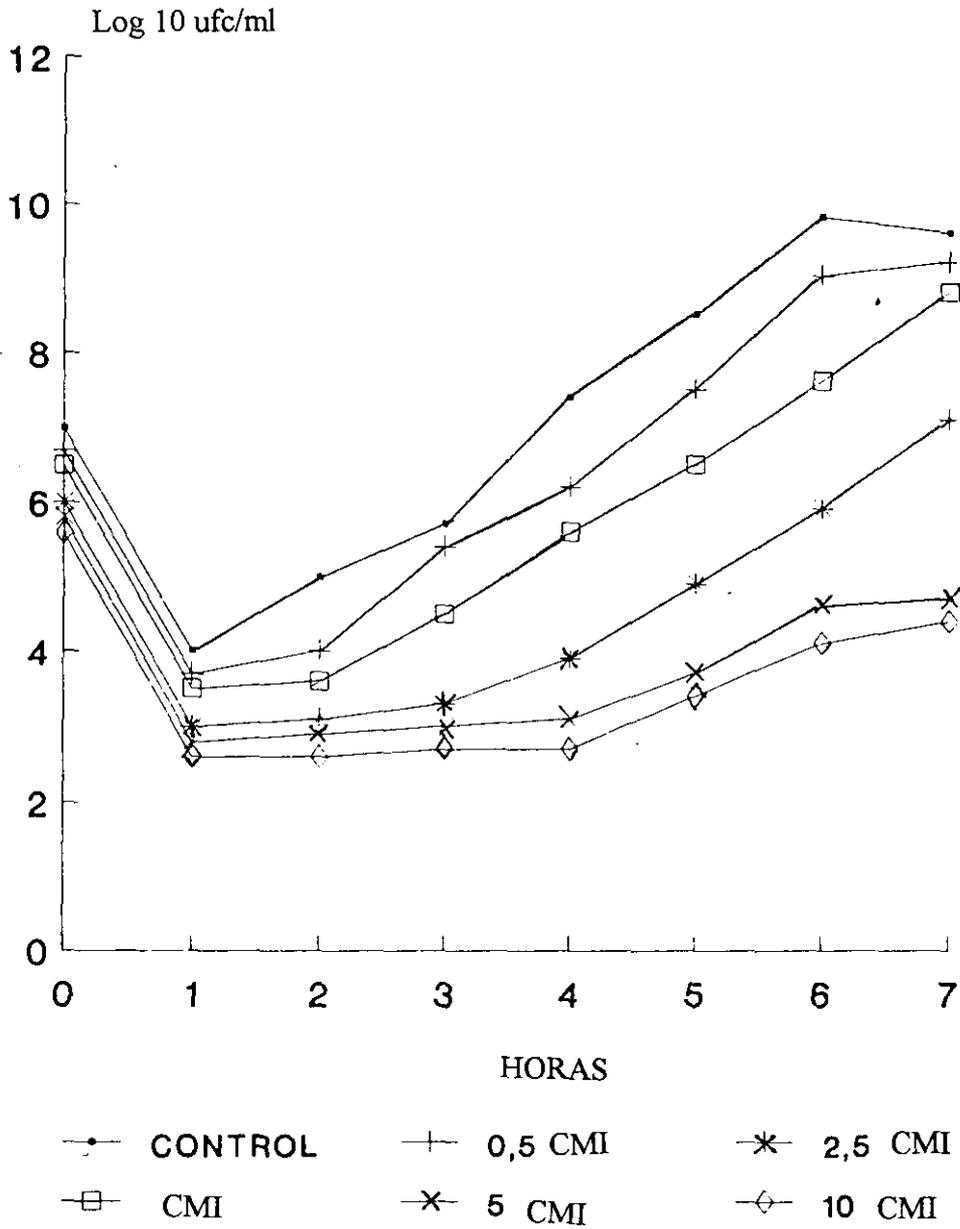
Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 55 (Gomez-Lus ML, Barrientos S, Rubias JM, Heredia S, Giménez MJ, Prieto J, 1993).

Figura 1. Curvas de muerte bacteriana de rifloxacina frente a *E. coli*.



Tomado de la cita bibliográfica 54 (Gomez-Lus ML, Barrientos S, Rubias JM, Heredia S, Giménez MJ, Prieto J, 1993).

Figura 2. Efecto post-antibiótico de rufloxacina frente a *E. coli*.



Tomado de la cita bibliográfica 54 (Gomez-Lus ML, Barrientos S, Rubias JM, Heredia S, Giménez MJ, Prieto J, 1993).

Tabla 4: Susceptibilidad in vitro de los aislamientos iniciales en el estudio Fase III en ITU

	RUFLOXACINA				NORFLOXACINA			
	n	CMI ₅₀	CMI ₉₀	RANGO	n	CMI ₅₀	CMI ₉₀	RANGO
<i>E. coli</i>	70	0,5	1	0,25-16	56	0,03	0,125	0,03-1
<i>P. mirabilis</i>	5	-	-	2-2	7	0,03	0,125	0,03-0,125
<i>S. saprophyticus</i>	3	-	-	2-4	7	4	4	0,5-4
<i>K. pneumoniae</i>	3	-	-	0,25-8	3	-	-	0,125-0,25
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	1	-	-	4
<i>C. diversus</i>	1	-	-	0,5	-	-	-	-
Total	82				74			

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 67 (Del Rio G, Dalet F, Giménez MJ, Caffaratti J, Aguilar L, 1996) y de la cita bibliográfica 68 (Del Rio G, Dalet F, Aguilar L, Caffaratti J, Dal-Ré R, 1996).

Tabla 5. Caracterización de las cepas aisladas y susceptibilidad microbiológica

Paciente número	Auxotipo Muestra inicial	Serotipo Muestra inicial	CMI ($\mu\text{g/ml}$) Muestra inicial				Auxotipo Muestra seguimiento	Serotipo Muestra seguimiento	CMI ($\mu\text{g/ml}$) Muestra seguimiento			
			Tetra	Cip	Nor	Ruf			Tetra	Cip	Nor	Ruf
1	Prototrófico	IBoyst	1	0,003	0,03	0,25	Prototrófico	IBoyst	4	>0,12	2	8
2	Prolina	IBoyst				0,25						
3	Prototrófico	IBoys				0,25						
4	Prototrófico	IBoys				0,25						
5	Prototrófico	IBropst	1	0,003	0,03	0,25	Prototrófico	IBropst	4	>0,12	2	8
6	Prototrófico	IBoys				0,25						

Tetra: tetraciclina; Cip: ciprofloxacina; Nor: norfloxacina y Ruf: rufloxacina

Tomado de la cita bibliográfica 69 (Vila J, Olmos L, Ballesteros J, Vazquez JA, Giménez MJ, Marco F, Aguilar L, 1997).

Tabla 6. Niveles séricos (media \pm desviación estándar) de rufloxacina y norfloxacina determinados en los doce voluntarios sanos incluidos en el ensayo clínico Fase I.

TIEMPO	RUFLOXACINA		NORFLOXACINA	
	Nº MUESTRAS*	NIVEL SÉRICO ($\mu\text{g/ml}$)	Nº MUESTRAS	NIVEL SÉRICO ($\mu\text{g/ml}$)
2	12	$4,6 \pm 0,7^a$	12	$1,1 \pm 0,3^a$
4	12	$4,2 \pm 0,7^a$	12	$0,7 \pm 0,4^a$
6	12	$4,2 \pm 0,9^a$	9	$0,5 \pm 0,2^a$
8	12	$4,0 \pm 0,8^a$	8	$0,3 \pm 0,1^a$
12	12	$3,7 \pm 0,7^a$	4	$0,2 \pm 0,1^a$
24	12	$3,3 \pm 0,8^a$	1	$0,1^a$
48	12	$2,2 \pm 0,9$	0	
72	10	$0,9 \pm 0,5$	0	

* Nº de muestras con concentraciones antibióticas por encima del límite de detección (0,50 y 0,12 $\mu\text{g/ml}$ para rufloxacina y norfloxacina respectivamente)

^a Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$)

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 56 (Balcabao IP, Jiménez de Anta MT, Salvá P, Martín M, Marco F, Costa J, Giménez MJ, Aguilar L, 1993) y de la cita bibliográfica 61 (Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R, 1996)

Tabla 7. Niveles en orina (media \pm desviación estándar) de rufloxacin y norfloxacin determinados en los doce voluntarios sanos incluidos en el ensayo clínico Fase I.

TIEMPO	RUFLOXACINA		NORFLOXACINA	
	Nº MUESTRAS*	NIVEL EN ORINA ($\mu\text{g/ml}$)	Nº MUESTRAS	NIVEL SÉRICO ($\mu\text{g/ml}$)
0-2	12	44,7 \pm 19,7 ^a	12	167,0 \pm 100,0 ^a
2-4	12	44,1 \pm 12,1 ^a	12	85,0 \pm 42,3 ^a
4-8	12	36,0 \pm 5,2 ^a	12	58,8 \pm 27,4 ^a
8-12	12	43,5 \pm 22,2	12	41,1 \pm 21,9
12-16	12	43,5 \pm 12,3 ^b	12	26,6 \pm 19,5 ^b
16-24	12	45,2 \pm 10,5 ^b	12	15,6 \pm 14,0 ^b
24-36	12	48,3 \pm 22,3 ^b	12	4,8 \pm 2,4 ^b
36-48	12	47,0 \pm 8,1 ^b	11	2,8 \pm 2,1 ^b
48-60	12	37,2 \pm 9,3 ^b	4	1,0 \pm 0,5 ^b
60-72	12	38,5 \pm 8,9 ^b	1	1 ^b

* Nº de muestras con concentraciones antibióticas por encima del límite de detección (1,25 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para rufloxacin y norfloxacin respectivamente)

^a Niveles significativamente ($P < 0,05$) superiores para norfloxacin.

^b Niveles significativamente ($P < 0,05$) superiores para rufloxacin.

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 56 (Balcabao IP, Jiménez de Anta MT, Salvá P, Martín M, Marco F, Costa J, Giménez MJ, Aguilar L, 1993) y de la cita bibliográfica 61 (Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R, 1996)

Tabla 8. Niveles en heces (media \pm desviación estándar) de rufloxacina y norfloxacina determinados en los doce voluntarios sanos incluidos en el ensayo clínico Fase I.

TIEMPO	RUFLOXACINA				NORFLOXACINA			
	Nº MUESTRAS*	NIVEL EN HECES ($\mu\text{g/g}$)	MINIMO	MAXIMO	Nº MUESTRAS*	NIVEL EN HECES ($\mu\text{g/g}$)	MINIMO	MAXIMO
0	12	0	0	0	10	0	0	0
48	12	94,08 \pm 73,19 ^a	26,33	304,79	10	302,01 \pm 267,47 ^a	13,32	1030,2
72	12	76,61 \pm 56,51	8,22	231,82	10	75,78 \pm 65,07	7,13	170,84
168	9	18,71 \pm 16,54 ^b	9,08	61,44	1	4,38 ^b	4,38	4,38

* Nº de muestras con concentraciones antibióticas por encima del límite de detección (1 y 0,5 $\mu\text{g/g}$ para rufloxacina y norfloxacina respectivamente)

^a Niveles significativamente ($P < 0,01$) superiores para norfloxacina.

^b Niveles significativamente ($P < 0,05$) superiores para rufloxacina.

Tomado de la cita bibliográfica 66 (Marco F, Giménez MJ, Jiménez de Anta MT, Marcos MA, Salvá P, Aguilar L, 1995) y del poster correspondiente a la cita bibliográfica 65 (Marcos MA, Marco F, Jimenez de Anta MT, Gómez J, Vedia C, Giménez MJ, Aguilar L, 1994).

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos (media \pm desviación estándar) de rufloxacina y norfloxacina en suero y orina determinados en los doce voluntarios sanos incluidos en el ensayo clínico Fase I.

Antimicrobiano y compartimento	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC (μg.h/ml)	CL/F (ml/min/kg)	V/F (L/μg)	MRT (h)	Ae (μg)
Rufloxacina								
Suero	4,9 \pm 0,8	3,5 \pm 2,11	28,0 \pm 15,5	238,7 \pm 91,5	0,5 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	43,3 \pm 20,6	
Orina		8,8 \pm 4,8		221.105,2 \pm 88.004,7			28,2 \pm 3,6	9.618,5 \pm 5.580,6
Norfloxacina								
Suero	1,1 \pm 0,3	2,0 \pm 0	2,8 \pm 2,1	5,9 \pm 3,1	20,1 \pm 10,0	4,2 \pm 1,2	5,3 \pm 2,7	
Orina		4,3 \pm 2,8		166.037,5 \pm 66.311,9			7,8 \pm 1,1	23.776,0 \pm 14.103,2

C_{max}=concentración máxima en suero; T_{max}=tiempo en alcanzar la concentración máxima en suero; t_{1/2} = semivida; AUC= área bajo la curva concentración-tiempo (0 a infinito para suero y 0 a 72 h para orina); CL/F= aclaramiento/biodisponibilidad; V/F= volumen de distribución/biodisponibilidad; MRT= tiempo de residencia medio; Ae= concentración máxima alcanzada en orina en relación al tiempo en alcanzar la concentración máxima en suero.

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 58 (Costa J, Vedia C, Balcabao IP, García-Vicente JA, Montero J, Giménez MJ, Aguilar L, Salvá P, 1994)) y de la cita bibliográfica 61 (Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R, 1996)

Tabla 10. Tasa de muerte bacteriana frente a *Escherichia coli* obtenida con la orina de seis voluntarios incluidos en el ensayo clínico Fase I.

Tasa de muerte bacteriana (% Descenso del inóculo inicial*- Media + desviación estándar)

TIEMPO	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	0-2 h	8-12 h	60-72 h	0-2 h	8-12 h	60-72 h
1	88,37 ± 7,64	87,27 ± 8,88	90,31 ± 4,70	89,68 ± 4,83 ^a	95,85 ± 3,0 ^a	0
2	98,33 ± 1,02	98,39 ± 0,98	98,66 ± 0,91	97,81 ± 0,91 ^a	99,27 ± 0,57 ^a	0
3	99,63 ± 0,15	99,72 ± 0,14	99,75 ± 0,52	99,44 ± 0,22	99,68 ± 0,33	0
4	99,86 ± 0,1	99,92 ± 0,03	99,86 ± 0,08	99,83 ± 0,06	99,89 ± 0,02	0

*Inóculo inicial aproximadamente 10⁷ ufc/ml.

^aDiferencias estadísticamente significativas (P< 0,05)

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 64 (Balcabao IP, Martín M, Giménez MJ, Costa J, Solana P, Aguilar L, Prieto J, 1994)) y de la cita bibliográfica 61 (Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R, 1996).

Tabla 11. Títulos bactericidas séricos -mediana (rango)- y AUBCs de rufloxacina y norfloxacina determinados frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 en los doce voluntarios sanos incluidos en el ensayo clínico Fase I.

Tiempo	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	Nº muestras*	Título bactericida sérico		Nº muestras	Título bactericida sérico	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
2	12	8 (4-16)	2 (2-8)	12	8 (4-16)	2 (<2-8)
4	12	4 (4-16)	2 (<2-4) ^b	12	4 (2-8)	2 (<2-4) ^b
6	12	4 (4-16)	2 (2-8) ^b	9	2 (<2-8)	<2 (<2-2) ^b
8	12	4 (2-8) ^a	2 (<2-4) ^b	8	2 (<2-4) ^a	<2 (<2-2) ^b
12	12	4 (2-8) ^a	1 (<2-4) ^b	4	<2 (<2-2) ^a	<2 (<2-<2) ^b
24	12	3 (2-8) ^a	1 (<2-4) ^b	1	<2 ^a	<2 ^b
48	12	2 (<2-4)	<2 (<2-2)	0		
72	12	<2 (<2-2)	<2 (<2-<2)	0		
	AUBC	171 (82-320)	45 (18-178)	AUBC	29 (20-92)	8 (0-34)

^aDiferencias estadísticamente significativas (P< 0,01)

^bDiferencias estadísticamente significativas (P< 0,05)

Tomado de la cita bibliográfica 61 (Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R, 1996)

Tabla 12. Títulos bactericidas en orina -mediana (rango)- y AUBCs de rufloxacina y norfloxacina determinados frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 en los doce voluntarios sanos incluidos en el ensayo clínico Fase I.

Tiempo	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	Nº muestras*	Título bactericida en orina		Nº muestras	Título bactericida en orina	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0-2	12	64 (4-512) ^a	16 (2-512)	12	256 (128-1024) ^a	128 (32-256)
2-4	12	64 (16-256) ^a	16 (8-64)	12	256 (64-256) ^a	64 (8-256)
4-8	12	64 (16-64) ^a	16 (2-32)	12	128 (32-256) ^a	32 (4-128)
8-12	12	32 (16-512)	16 (2-128)	12	96 (32-256)	8 (4-32)
12-16	12	64 (16-128)	16 (8-64)	12	32 (16-128)	8 (4-32)
16-24	12	64 (16-256) ^b	16 (4-128) ^b	12	16 (4-64) ^b	4 (<2-32) ^b
24-36	12	64 (4-1024) ^b	16 (2-256) ^b	12	6 (<2-16) ^b	2 (<2-8) ^b
36-48	12	64 (32-128) ^b	16 (4-64) ^b	12	2 (<2-16) ^b	<2 (<2-2) ^b
48-60	12	48 (4-128) ^b	16 (2-32) ^b	12	<2 (<2-2) ^b	<2 (<2-<2) ^b
60-72	12	64 (16-128) ^b	16 (8-16) ^b	12	<2 (<2-2) ^b	<2 (<2-<2) ^b

^a Títulos significativamente (P< 0,05) superiores para norfloxacina.

^b Títulos significativamente (P< 0,05) superiores para rufloxacina.

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 63 (Balcabao IP, Martín M, Costa J, Giménez MJ, Salvá P, Aguilar L, 1993) y de la cita bibliográfica 61 (Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R, 1996).

Tabla 13. Mediana (rango) de títulos bactericidas y bacteriostáticos, niveles en orina, CMI y cocientes inhibitorios determinados en el subgrupo de 26 pacientes con *Escherichia coli* como aislamiento inicial.

	TITULO BACTERICIDA	TITULO BACTERIOSTATICO	NIVEL EN ORINA ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	COCIENTE INHIBITORIO*
RUFLOXACINA N= 14	8 (0 - 32)	16 (1 - 64)	24,75 (12,5 - 52)	0,5 (0,25 - 8)	55,5 (1,97 - 191)
NORFLOXACINA N=12	24 (2 - 64)	48 (4 - 128)	24,75 (3,15 - 160)	0,045 (0,03 - 0,125)	477,08 (25,2 - 5.333,33)

* Cociente inhibitorio: Nivel en orina/CMI

Tomado del poster correspondiente a la cita bibliográfica 67 (Del Rio G, Dalet F, Giménez MJ, Caffaratti J, Aguilar L, 1996) y de la cita bibliográfica 68 (Del Rio G, Dalet F, Aguilar L, Caffaratti J, Dal-Ré R, 1996).

Tabla 14: Unidades formadoras de colonias por gramo de heces (ufc/g) de *E. coli* en la muestra basal y porcentajes de descenso respecto a basal a los distintos tiempos.

RUFLOXACINA					NORFLOXACINA				
Volunt	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)	Volunt	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)
Nº.		0-48h	0-72h	0-168h	Nº.		0-48h	0-72h	0-168h
1	1,8x10 ⁸	99,90	99,99	71,11	1	1,2x10 ⁷	99,41	99,33	99,75
2	1,9x10 ⁶	99,52	97,89	98,68	2	5x10 ⁵	99,94	99,4	0
3	2,5x10 ⁸	97,2	99,88	100	3	3,1x10 ⁶	99,99	99,93	90,32
4	2,8x10 ⁵	0	0	0	4	6,1x10 ⁷	99,98	99,99	99,97
5	2,7x10 ⁶	96,51	100	100	5	*	*	*	*
6	1,9x10 ⁸	99,97	99,98	99,96	6	*	*	*	*

Tabla 14 (continuación):

RUFLOXACINA					NORFLOXACINA				
Volunt	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)	Volunt	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)
Nº.		0-48h	0-72h	0-168h	Nº.		0-48h	0-72h	0-168h
7	3,7x10 ⁷	99,97	99,72	75,67	7	1,3x10 ⁶	99,72	96,53	0
8	3x10 ⁶	99,20	92,66	78,33	8	2x10 ⁷	99,98	99,97	97,15
9	2x10 ⁵	40,00	0	0	9	1,4x10 ⁶	99,95	75,0	0
10	2,2x10 ⁶	90,90	99,86	99,93	10	2x10 ⁶	99,60	99,87	0
11	3,1x10 ⁷	98,70	99,03	99,97	11	1,6x10 ⁷	87,50	97,37	59,37
12	8x10 ⁶	92,50	98,12	99,99	12	4,8x10 ⁷	99,89	99,99	62,5

* Voluntarios no considerados por carecer de muestra basal (0h)

Tomado de la cita bibliográfica 66 (Marco F, Giménez MJ, Jiménez de Anta MT, Marcos MA, Salvá P, Aguilar L, 1995) y del poster correspondiente a la cita bibliográfica 65 (Marcos MA, Marco F, Jimenez de Anta MT, Gómez J, Vedia C, Giménez MJ, Aguilar L, 1994).

Tabla 15: Unidades formadoras de colonias por gramo de heces (ufc/g) de *B. fragilis* en la muestra basal y porcentajes de descenso respecto a basal a los distintos tiempos.

RUFLOXACINA					NORFLOXACINA				
Volunt.	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)	Volunt	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)
Nº.		0-48h	0-72h	0-168h	Nº.		0-48h	0-72h	0-168h
1	1,4x10 ⁹	0	0	0	1	2x10 ⁹	50	0	0
2	2x10 ⁹	50,00	55,00	86,00	2	6x10 ⁹	83,33	66,66	93,33
3	3x10 ⁸	93,33	0	0	3	6x10 ¹⁰	61,66	95	16,66
4	6x10 ⁹	50,00	93,33	0	4	4,3x10 ⁹	53,48	0	0
5	3x10 ¹⁰	93,66	60,00	0	5	*	*	*	*
6	3,6x10 ¹⁰	90,55	0	0	6	*	*	*	*

Tabla 15 (Continuación):

RUFLOXACINA					NORFLOXACINA				
Volunt.	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)	Volunt.	0h	Descenso (%)	Descenso (%)	Descenso (%)
Nº.		0-48h	0-72h	0-168h	Nº.		0-48h	0-72h	0-168h
7	1x10 ⁹	99,90	85,00	0	7	6,2x10 ⁹	3,22	0	0
8	6x10 ⁹	0	0	0	8	1,1x10 ¹⁰	0	0	0
9	6x10 ⁹	26,66	91,66	66,66	9	6x10 ⁹	16,66	0	0
10	6x10 ¹⁰	91,66	90,00	88,33	10	6x10 ⁹	50	0	0
11	6x10 ⁹	93,33	91,66	0	11	2,6x10 ⁸	23,07	91,15	23,07
12	6x10 ⁹	16,66	0	50,00	12	5,9x10 ⁹	89,83	99,83	0

* Voluntarios no considerados por carecer de muestra basal (0h)

Tomado de la cita bibliográfica 66 (Marco F, Giménez MJ, Jiménez de Anta MT, Marcos MA, Salvá P, Aguilar L, 1995) y del poster correspondiente a la cita bibliográfica 65 (Marcos MA, Marco F, Jimenez de Anta MT, Gómez J, Vedia C, Giménez MJ, Aguilar L, 1994).

Tabla 16: Porcentaje de voluntarios que presentaron descenso > 70% respecto a basal y descenso medio obtenido en dichos sujetos a los distintos tiempos.

				<i>E. coli</i>			
RUFLOXACINA			NORFLOXACINA				
	48h	72h	168h		48h	72h	168h
% voluntarios con	83,33%	83,33%	83,33%	% voluntarios con	100	100	40
descenso > 70%	(10/12)	(10/12)	(10/12)	descenso > 70%	(10/10)	(10/10)	(4/10)
% descenso medio en	97,43%	98,71%	92,36%	% descenso medio en	98,59%	96,73%	96,79%
estos voluntarios	(n=10)	(n=10)	(n=10)	estos voluntarios	(n=10)	(n=10)	(n=4)

				<i>B. fragilis</i>			
RUFLOXACINA			NORFLOXACINA				
	48h	72h	168h		48h	72h	168h
% voluntarios con	50%	41,66%	16,66%	% voluntarios con	20%	30%	10%
descenso > 70%	(6/12)	(5/12)	(2/12)	descenso > 70%	(2/10)	(3/10)	(1/10)
% descenso medio en	93,73%	90,33%	87,16%	% descenso medio en	86,58%	95,32%	93,33%
estos voluntarios	(n=6)	(n=5)	(n=2)	estos voluntarios	(n=2)	(n=3)	(n=1)

Tomado de la cita bibliográfica 66 (Marco F, Giménez MJ, Jiménez de Anta MT, Marcos MA, Salvá P, Aguilar L, 1995) y del poster correspondiente a la cita bibliográfica 65 (Marcos MA, Marco F, Jimenez de Anta MT, Gómez J, Vedia C, Giménez MJ, Aguilar L, 1994).

Tabla 17: Títulos bactericidas teóricos, experimentales, razón título experimental/teórico y área bajo la curva de actividad bactericida (AUBC) en orina de rufloxacina y norfloxacina a los distintos tiempos frente a *E. coli* ATCC 25922 expresado como mediana (rango) (n= 12 excepto donde se indica).

Tiempo (h)	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico
0-2	16 (4-32)	64 (4-512)	4 (1-16)**	384 (128-1.024)	256 (128-1.024)	0,8 (0-2)**
2-4	16 (8-16)*	64 (16-256)*	4 (2-16)**	256 (64-512)	256 (64-256)	1 (1-2)**
4-8	16 (8-16)*	64 (16-64)*	4 (2-8)**	192 (32-256)	128 (32-256)	1 (1-2)**
8-12	16 (8-32)*	32 (16-512)*	3 (2-16)	128 (32-256)	96 (32-256)	1 (0-2)
12-16	16 (8-32)*	64 (16-128)*	4 (2-8)	64 (16-128)	32 (16-128)	0,8 (0-4)
16-24	16 (8-32)*	64 (16-256)*	4 (2-16)**	32 (16-128)	16 (4-64)	0,5 (0-1)**

Tabla 17 (Continuación):

Tiempo (h)	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico
24-36	16 (4-32)	64 (4-1.024)	4 (1-32)**	16 (4-32)	6 (0-16)	0,5 (0-1)**
36-48	16 (16-32)*	64 (32-128)*	4 (2-8)	4 (0-16)	2 (0-16)	0,5 (0-1) ^a
48-60	16 (4-16)	48 (4-128)	3 (1-8)	0 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-1) ^b
60-72	16 (8-16)	64 (16-128)	4 (1-8)	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (1-1) ^c
AUBC	1.116 (784-1.680)*	4.116 (2.240-22.400)*	4 (2-18)**	3.848 (1.408-7.288)	2.320 (1.048-4.992)	0,7 (0-2)**

* $p < 0,001$ teórico vs. experimental (intragrupo);

** $p < 0,001$ experimental/teórico rufloxacina vs. norfloxacina;

a: 10 voluntarios con título teórico > 0 ; b: 4 voluntarios con título teórico > 0 ; c: 1 voluntario con título teórico > 0

Tomada del poster correspondiente a la cita bibliográfica 60 (Gimenez MJ, Aguilar L, Costa J, Dal-Ré R, Vedia C, Salvá P, 1996) y la cita bibliográfica 62 (Aguilar L, Giménez MJ, Costa J, Dal-Ré R, Prieto J, 1997)

Tabla 18: Títulos bactericidas teóricos, experimentales, razón título experimental/teórico y área bajo la curva de actividad bactericida (AUBC) en orina de rufloxacina y norfloxacina a los distintos tiempos frente a *S. aureus* ATCC 29213 expresado como mediana (rango) (n= 12 excepto donde se indica).

Tiempo (h)	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico
0-2	8 (2-16)	16 (2-512)	2 (1-32)	96 (32-256)	128 (32-256)	1 (1-4)
2-4	8 (4-8)*	16 (8-64)*	2 (2-8)	64 (16-128)	64 (8-256)	0,5 (1-4)
4-8	8 (4-8)	16 (2-32)	2 (1-4)	48 (8-64)	32 (4-128)	0,5 (0-2)
8-12	8 (4-16)	16 (2-128)	2 (1-8)	32 (8-64)	8 (4-32)	0,5 (0-1)
12-16	8 (4-16)	16 (8-64)	2 (1-8)	16 (4-32)	8 (4-32)	0,5 (0-2)
16-24	8 (4-16)	16 (4-128)	2 (1-16)	8 (4-32)	4 (0-32)	0,4 (0-2)

Tabla 18 (Continuación):

Tiempo (h)	RUFLOXACINA			NORFLOXACINA		
	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico	Teórico	Experimental	Experimental/ Teórico
24-36	8 (2-16)	16 (2-256)	2 (1-16)	4 (0-8)	2 (0-8)	1 (0-2) ^a
36-48	8 (8-16)	16 (4-64)	2 (1-8)	1 (0-4)	0 (0-2)	0,3 (0-1) ^b
48-60	8 (2-8)	16 (2-32)	2 (1-4)	0 (0-0)	0 (0-0)	
60-72	8 (4-8)	16 (8-16)	2 (1-2)	0 (0-0)	0 (0-0)	
AUBC	558 (392-840)*	1.096 (720-7.200)*	2,1 (1-9)**	956 (352-1.816)	736 (200-2.552)	0,7 (0-2)**

* p < 0,001 teórico vs. experimental (intragrupo);

** p < 0,001 experimental/teórico rufloxacina vs. norfloxacina

a: 11 voluntarios con títulos teóricos > 0; b: 6 voluntarios con títulos teóricos > 0

Tomada del poster correspondiente a la cita bibliográfica 60 (Gimenez MJ, Aguilar L, Costa J, Dal-Ré R, Vedia C, Salvá P, 1996) y la cita bibliográfica 62 (Aguilar L, Giménez MJ, Costa J, Dal-Ré R, Prieto J, 1997)

DISCUSIÓN

Como ya comenté en la introducción de esta tesis, el resultado de la administración de un antimicrobiano para el tratamiento de una infección depende de la interacción tridimensional bacteria-huésped-antimicrobiano; interacción imposible de estudiar *in vitro* y que condiciona que la predicción de eficacia que se realiza se base en los datos obtenidos del estudio de las diferentes interacciones bidimensionales de estos tres factores. Así, los test de susceptibilidad *in vitro* se pueden considerar una medida de la interacción bacteria-antimicrobiano; la farmacocinética del compuesto, una medida de la interacción huésped-antimicrobiano; y la actividad bactericida del suero y orina, una medida de la interacción huésped-bacteria, siempre con las consiguientes limitaciones de cada uno de estos tests. Teniendo en cuenta lo anterior, podemos analizar e interpretar los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados en tres puntos:

-Microbiología/Elección de la patología, como representación de la interacción bacteria-antimicrobiano

-Farmacocinética/Pautas de dosificación, como representación de la interacción huésped-antimicrobiano

-Farmacodinamia/Predicción de eficacia, como representación de la interacción huésped-bacteria

Posteriormente la relación de los resultados obtenidos de cada una de estas interacciones, nos permitirá concluir las indicaciones resultantes, la pauta de dosificación y la posible utilización de rufloxacin en la práctica clínica en el campo de las infecciones genitourinarias.

1- Microbiología/Elección de la patología

Los tests *in vitro* de susceptibilidad no reproducen las condiciones *in vivo* debido, entre otros, a tres factores: 1- Los mecanismos de defensa del huésped (factores del sistema inmune) no están presentes en el medio; 2- Se crea un sistema estático donde la concentración de antibiotico es constante y éste está en contacto con la bacteria durante todo el tiempo de incubación (en contraposición a lo que ocurre *in vivo* donde las

bacterias están expuestas a concentraciones antibióticas fluctuantes), y 3- Se utiliza un inóculo bacteriano estándar que probablemente no se corresponde con el de in vivo debido a que nunca se ha establecido un inóculo terapéuticamente equivalente (21). Además existen distintos factores de laboratorio que pueden modificar la determinación in vitro: pH, osmolaridad, temperatura etc. Por otra parte, la lectura de los resultados de CMI o CMB se realiza tras 24 horas de incubación, pudiendo resultar la misma lectura para dos antimicrobianos que presenten distinta actuación en los tiempos iniciales de este periodo (85), ya que estos hechos farmacodinámicos iniciales no son evaluados como tales al realizarse sólo una lectura global a las 24 horas, periodo que puede ser diferente al intervalo de dosificación. Por otro lado, estos hechos farmacodinámicos iniciales pueden ser los más relevantes de todo el periodo de lectura (85). Si consideramos todo lo anterior, no resulta difícil entender que la respuesta obtenida in vitro no presente siempre una correlación directa con la eficacia obtenida in vivo, obteniéndose in vitro sólo una cruda predicción de la respuesta terapéutica obtenida en el paciente (86, 87).

A pesar de las reservas existentes sobre la relevancia clínica de los test in vitro, la determinación de la CMI permite delimitar el espectro de acción del antimicrobiano ensayado y establecer aquellas infecciones en las que se debe ensayar éste, ya que el microorganismo causante de la infección ha demostrado ser susceptible in vitro a las concentraciones determinadas. El conocimiento del espectro diferencial de actividad de los antimicrobianos es importante en la predicción de eficacia y por tanto tiene una influencia crucial en el programa de desarrollo de un fármaco en investigación (88) como parte de la evaluación de susceptibilidad inicial.

Los estudios in vitro realizados con los 350 aislados clínicos en orina confirmaron los datos preexistentes de la quinolona, obteniéndose la misma CMI₉₀ frente a *E. coli* (4µg/ml). Las curvas de muerte bacteriana demostraron una acción rápida de rufloxacin que produjo una reducción del inóculo inicial del 99,9% (porcentaje considerado en la determinación de la CMB tras 24 h de exposición) tras sólo 2 horas de incubación (con concentraciones 10xCMI) o 3 horas de incubación (con concentraciones iguales a la CMI), por ello con esta metodología y esta cepa no se demostró claramente una acción

concentración-dependiente de rufloxacina como se ha descrito para otras quinolonas, pero por el contrario sí se aprecia esta dependencia en la determinación del efecto post-antibiótico, como puede observarse en la gráfica 2, estando así en concordancia con el efecto post-antibiótico dosis-dependiente descrito para este tipo de antimicrobianos (89). La escasa actividad in vitro (CMI₉₀ altas si se comparan con las de otras quinolonas) unido a la ausencia de dosis dependencia demostrada podían suponer un handicap para esta quinolona en su eficacia terapéutica.

Los datos de susceptibilidad de las cepas aisladas en el ensayo clínico Fase III en ITU confirman asimismo los datos previos, indicando una mayor susceptibilidad de los aislados de *E. coli* a norfloxacin (CMI₉₀ = 0,125 µg/ml) que a rufloxacin (CMI₉₀ = 1 µg/ml), aunque la CMI₉₀ de ésta última es, en este ensayo, 4 veces inferior a la del estudio in vitro previamente realizado, a pesar de que las 350 cepas del estudio in vitro procedían también de pacientes con infección extrahospitalaria, aunque de distinta localización geográfica. Si se considera el resto de microorganismos aislados en este ensayo Fase III, y a pesar de que el número de estos aislados es pequeño, también se confirman los datos in vitro previos (47, 48), con buena actividad frente a *P. mirabilis* y *S. saprophyticus*.

La susceptibilidad de los aislados iniciales de *N. gonorrhoeae* en el ensayo clínico Fase III en uretritis gonocócicas, confirmó asimismo los resultados previos (46) in vitro que indicaban una buena actividad de rufloxacin (CMI₉₀ = 0,5 µg/ml), aunque en nuestro caso se trata igualmente de un número muy pequeño de aislados, a pesar de los fracasos clínicos y microbiológicos obtenidos en el ensayo.

Aplicando los valores de C_{max} (4,9 µg/ml) y semivida (28 h) obtenidos en el ensayo clínico Fase I para determinar los “breakpoint”, mediante la fórmula establecida por la “British Society for Chemotherapy” (5) reseñada en el apartado 2.1 de la Introducción, y considerando una unión a proteínas del 60% (90), los valores obtenidos para rufloxacin son 4 µg/ml y 1 µg/ml, según se considere un índice terapéutico de 4 o de 10 respectivamente. Los valores así determinados concuerdan en parte con los publicados

por el “European Study Group on Antibiotic Breakpoints” (91) que establece tres categorías: Susceptible ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$), Intermedia ($4 \mu\text{g/ml}$) y Resistente ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$). De los datos de susceptibilidad obtenidos y considerando estos “breakpoints”, podemos concluir que rufloxacina no sería adecuada para el tratamiento de infecciones parenquimatosas, debido a que los patógenos responsables de la infección están incluidos (al menos) en la categoría intermedia de susceptibilidad, presentando por tanto rufloxacina una actividad sistémica reducida. Sin embargo, como ya se describió en la introducción de esta tesis, estos “breakpoints” pueden no ser adecuados como puntos de corte para el tratamiento de las cistitis no complicadas si los niveles en orina son más altos que los niveles séricos alcanzados, como ocurre con rufloxacina que mostró unos niveles en orina mantenidos durante 72 h y aproximadamente 10 veces superiores a los niveles séricos determinados. Así, se considera que infecciones producidas por cepas con CMI intermedia a un determinado antimicrobiano, pueden ser tratadas con este compuesto si se administran dosis altas o con las dosis habituales, si la infección se localiza en lugares donde el antimicrobiano esté concentrado como ocurre en orina.

Por tanto, de los estudios de susceptibilidad in vitro realizados se concluyó que las patologías a elegir para determinar la eficacia de rufloxacina en pacientes debían ser cistitis no complicada dentro de las infecciones urinarias y gonococia dentro de las ETS por la buena actividad in vitro presentada por rufloxacina. Los datos de susceptibilidad in vitro de los microorganismos responsables de infección en los ensayos clínicos posteriormente realizados confirmaron la correcta elección de la patología si se evalúa independientemente de los resultados clínicos y microbiológicos obtenidos.

2- Farmacocinética/Pautas de dosificación

Los parámetros farmacocinéticos de rufloxacina determinados en el ensayo clínico Fase I fueron similares a los descritos por otros autores (92), pudiéndose deber las pequeñas diferencias encontradas a la diferente metodología utilizada (92). Asimismo, en un estudio previo los niveles de rufloxacina determinados por método microbiológico

fueron superiores a los determinados por HPLC; los autores sugerían que esta diferencia podía deberse a la presencia de un metabolito activo (50), sin embargo esta sugerencia es discutible como se podrá comprobar más adelante en esta discusión.

Entre los parámetros determinados para rufloxacina en el ensayo Fase I, cabe destacar la larga semivida determinada (28 horas), característica de esta quinolona. Los niveles máximos de rufloxacina en suero fueron aproximadamente 4,5 veces superiores a los niveles máximos alcanzados por norfloxacina. Este hecho unido a la diferencia de las semividas determinadas para ambas quinolonas explica las diferencias de AUC, que es aproximadamente 40 veces superior para rufloxacina. Sin embargo, como ya se ha comentado, los niveles séricos no se correlacionan con eficacia clínica en las ITU. Respecto a los resultados obtenidos en orina, los niveles de norfloxacina durante las primeras 4-8 horas tras la administración de la dosis fueron muy superiores a los de rufloxacina que, aunque presentó niveles inferiores (40 µg/ml) a estos tiempos, demostró mantener niveles prácticamente constantes durante las 72 horas medidas post-dosificación.

En la ITU aguda no complicada en mujeres, clásicamente el tratamiento consistía en 7-10 días de terapia con un antimicrobiano, ya que todos los antimicrobianos orales que presenten espectro de actividad frente a bacterias gram negativas, erradican la infección en más del 80% de los pacientes si se administran por un periodo de 7-14 días (11). Sin embargo, y considerando que la infección de vías bajas es una infección superficial de la mucosa, se introdujeron con éxito regímenes más cortos (3 días de tratamiento o dosis única) (93-95). Estos tratamientos más cortos, con la misma eficacia antimicrobiana, presentaban las ventajas de tener menor incidencia de efectos indeseados (menos del 5% de pacientes que son tratados con dosis única presentan efectos adversos que requieran intervención médica (11)), menor coste, asegurar mejor el cumplimiento del tratamiento por el paciente, y quizá, ejercer una menor presión selectiva para la aparición de resistencias sobre la flora rectal, urinaria y vaginal (96, 97). Sin embargo, no todos los antibióticos son susceptibles de esta pauta de dosificación: solamente aquellos que presentan niveles altos y sostenidos en orina, asegurando concentraciones al menos

durante 12-24 horas que eliminen la infección localizada en la vejiga, son idóneos para el régimen de dosis única (19, 98). Sin embargo, los últimos estudios realizados para evaluar la eficacia de tratamientos de tres días de duración versus tratamientos de dosis única, han demostrado que los primeros presentan los beneficios de los tratamientos de dosis única, preservando en mayor medida que éstos la eficacia de la terapia convencional (43, 99). Los tratamientos de dosis única se asocian con un mayor porcentaje de recurrencias que los tratamientos convencionales o de tres días de duración, probablemente debido a su menor efectividad en la erradicación de *E. coli* y otros uropatógenos del reservorio vaginal (y del tracto gastrointestinal que es la fuente de la colonización vaginal) (11, 99, 100, 101). En general, los tratamientos de dosis única presentaron menor eficacia cuando el microorganismo infectante era *S. saprophyticus* (99, 101), aunque este mismo resultado se obtuvo en aquellos estudios que compararon tratamientos de tres días de duración con tratamientos más largos, ya que la erradicación de *S. saprophyticus* fue mayor en los tratamientos más largos (102-104). Esto es importante si consideramos que en mujeres jóvenes y sexualmente activas, *S. saprophyticus* es el uropatógeno aislados en un 10-20% de casos (97). Por todo lo expuesto anteriormente, en la actualidad se aboga preferentemente por tratamientos cortos de 3 días de duración en la ITU aguda no complicada en mujeres (11, 43, 101), recomendándose la utilización de la dosis única en mujeres con un primer episodio o con un episodio aislado de cistitis y la pauta de 3 días en mujeres con múltiples episodios recientes (11).

Si consideramos los resultados obtenidos en los ensayos realizados, en donde rufloxacina presenta unos niveles en orina de aproximadamente 40 µg/ml al menos durante 72 horas (intervalo medido en el Fase I), podemos considerar que con una sólo dosis (y por tanto, con la ventajas descritas anteriormente para este régimen de dosificación) se consiguen niveles en orina aproximadamente 10-40 veces la CMI frente a *E. coli* de acuerdo con los datos de los estudios in vitro realizados (según se considere una CMI₉₀ de 4 o 1 respectivamente) durante tres días, lo que equivaldría a un regimen de tres días de duración de un antimicrobiano convencional. Paralelamente y como se comentará más

adelante, la actividad bactericida se mantiene asimismo durante al menos el mismo intervalo post-dosificación.

Los datos obtenidos en orina en el ensayo de Fase I son avalados por el estudio realizado en la orina de 12 horas aportada por las pacientes incluidas en el ensayo Fase III en ITU (orina recogida en el intervalo 72-84 horas después de la dosis única de rufloxacina o la primera dosis de norfloxacin), donde comparando los niveles urinarios de norfloxacin como ejemplo de terapia de 3 días de duración y de rufloxacin con dosis única, se observa que son iguales a pesar de las pautas de dosificación tan diferentes empleadas. Sin embargo si tenemos en cuenta la semivida de los dos fármacos (aproximadamente 28h para rufloxacin y 4h para norfloxacin), resulta lógico ya que el intervalo de toma de muestra se iniciaba en todas las pacientes aproximadamente 3 semividas después de la única o última dosis administrada. Por tanto, en el caso de rufloxacin, podemos obviar la discusión de si es preferible una pauta de 3 días de dosificación o de dosis única en el caso de cistitis no complicada, ya que una dosis única de rufloxacin proporciona niveles y una actividad bactericida mantenidos en orina durante al menos 3 días de duración.

Si analizamos los resultados obtenidos cuando *S. saprophyticus* fue el microorganismo aislado, y a pesar de no poder extraer conclusiones debido a que solamente esto ocurrió en tres pacientes del grupo de rufloxacin y en siete de norfloxacin, se observa que ambas quinolonas fueron efectivas en la erradicación del agente causante de la infección, tanto a corto como a largo plazo ya que ninguna de las recaídas fue debida a este microorganismo. Cabe destacar que la única paciente que presentó fracaso microbiológico con norfloxacin cuando *S. saprophyticus* fue el microorganismo aislado, presentó erradicación bacteriana en el cultivo realizado a los 3-7 días y cultivo positivo nuevamente en la visita de 8-12 días, por lo que en realidad debería considerarse una recurrencia y estaría de acuerdo con lo anteriormente mencionado de la mayor dificultad de erradicación de *S. saprophyticus*.

Asimismo es interesante destacar que en la visita de 3-7 días sólo se detectó un fracaso microbiológico con rufloxacin, correspondiendo a una cepa de *E. coli* con CMI > 16

$\mu\text{g/ml}$ en el cultivo inicial, mientras que a los 8-12 días se detectaron 3 fracasos debidos a cepas de *E. coli* sensibles a rufloxacina. En estos tres casos se puede considerar que no se trata de recurrencias sino de fracasos que, debido a la larga semivida de rufloxacina, no se detectaron en la visita previa por la presencia de niveles terapéuticos de la quinolona en orina.

Las características farmacocinéticas que deben considerarse para un antimicrobiano que se pretenda utilizar en el tratamiento de ITUs son: concentración en plasma, orina, tejido renal y heces (105). Considerando que el estudio de rufloxacina se limita a su utilización para cistitis no complicadas (debido a que los niveles séricos resultan no ser adecuados si se consideran las CMI frente a patógenos implicados en otro tipo de ITU), se puede excluir la necesidad del estudio de los niveles en parénquima renal. Una vez comentados los niveles en suero y orina, cabe comentar que los niveles en heces son importantes ya que pueden modificar el porcentaje de flora aerobia fecal y por tanto el riesgo de recurrencias tempranas (105). Los niveles de rufloxacina en heces determinados en el ensayo de Fase I demuestran que rufloxacina mantiene niveles fecales supra-CMI ($18 \mu\text{g/g}$) hasta siete días después de una dosis única, por lo que, considerando además su baja actividad frente a anaerobios (106), favorece que no se produzcan recurrencias tempranas en las pacientes. Sin embargo, en el estudio Fase III en ITU, se presentaron reinfecciones tanto en pacientes tratadas con rufloxacina como con norfloxacina. En todos los casos el agente causante fue una cepa de *E. coli* sensible al tratamiento aplicado. Sin embargo hay que considerar que la visita de seguimiento a largo plazo se realizaba 4-6 semanas después de una dosis única y que se habla de reinfecciones tempranas cuando éstas ocurren antes de dos semanas después de finalizar el tratamiento.

3- Farmacodinamia/Predicción de eficacia

La farmacodinamia de un antimicrobiano relaciona las concentraciones de éste obtenidas a lo largo del tiempo con los efectos antibacterianos en el lugar de la infección (107). Las

curvas de muerte bacteriana constituyen un método para evaluar in vitro esta relación, mediante la medición de la supervivencia bacteriana -representación semilogarítmica de recuentos de ufc/ml (en subcultivos cuantitativos) a distintos tiempos- tras exposición a distintas concentraciones farmacológicas.

Los resultados de las curvas de muerte bacteriana realizadas in vitro y ex vivo con rufloxacina demuestran una actividad rápidamente bactericida de ésta frente a un inóculo alto (aproximadamente 10^7 ufc/ml) en ambos casos. Las concentraciones de rufloxacina ensayadas en los dos experimentos son absolutamente diferentes, siendo concentraciones sub-CMI y supra- CMI (hasta 10 veces superiores) en el estudio in vitro y aproximadamente 40 veces la CMI en el estudio ex vivo. Los resultados obtenidos en el estudio in vitro demuestran que, tras 2 horas de incubación, se obtiene una reducción del inóculo inicial del 99,9%. En el estudio ex vivo, los resultados obtenidos son análogos, obteniéndose una reducción aproximadamente del 98% a las 2 horas y > 99,5% a las 3 horas en ambos casos, con la orina de las 0-2h, 8-12h y 60-72h. Existen diversos estudios que demuestran que en el caso de las fluoroquinolonas, concentraciones 30-60 veces la CMI son las que presentan máxima actividad bactericida (108, 109) y que concentraciones superiores a éstas, presentan una actividad menor, por lo que, las fluoroquinolonas exhiben un efecto paradójico (110). Si se analizan los resultados de las curvas realizadas ex vivo, se puede observar que los niveles de rufloxacina en orina de todos los periodos de toma de muestra estarían dentro del intervalo de máxima actividad respecto a *E. coli* y que norfloxacina presenta una actividad significativamente mayor en el intervalo 8-12 horas que en el intervalo 0-2 horas donde los niveles son cuatro veces superiores a los del intervalo anterior y se alejan mucho más de la concentración óptima bactericida. Por tanto en este caso se observa ex vivo el efecto paradójico descrito previamente in vitro por otros autores (110). En la orina del tercer intervalo ensayado en las curvas ex vivo (60-72 horas) no se detectaron niveles de norfloxacina, no obteniéndose decrementos del inóculo inicial. Esta alta actividad bactericida de rufloxacina in vitro y en las curvas ex vivo, se manifiesta igualmente al determinar los títulos bactericidas urinarios en el ensayo Fase I.

Si se analizan los títulos bactericidas séricos y se acepta un título $\geq 1:8$ que es el clásicamente considerado como adecuado en el valle (28, 29), los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que ninguna de las dos quinolonas es adecuada para infecciones sistémicas, como ya habíamos indicado con rufloxacina, ya que con cualquiera de las dos, sólo se obtiene un título $\geq 1:8$ en el primer tiempo de toma de muestra (2h) frente a *E. coli*. Si se considera un título $\geq 1:10$ que, como ya se explicó en la introducción de esta tesis se correlacionó con erradicación bacteriana en un modelo farmacodinámico in vitro previo realizado con una quinolona (42), se obtiene la misma conclusión, ya que a ningún tiempo se alcanza esta actividad bactericida por parte de ninguna de las dos quinolonas. En este análisis es necesario considerar que para la determinación de los títulos bactericidas se ha utilizado suero basal de cada voluntario con un 20% de caldo Isosensitest como medio, según estudios previos (111, 112), para simular al máximo las condiciones in vivo, considerando que sólo la fracción antibiótica libre (no unida a proteínas) es microbiológicamente activa (113). La utilización de caldo como diluyente en vez de suero del propio voluntario, puede llevar a determinar títulos bactericidas falsamente más altos (114) al no tenerse en cuenta la unión a proteínas. En los ensayos realizados, el suero utilizado como diluyente no fue previamente inactivado por calor, sin embargo su actividad bactericida era despreciable ya que la actividad bactericida sérica basal fue $< 1:2$.

Los fármacos concentración-dependiente como las fluoroquinolonas presentan una acción ligada al área bajo la curva concentración plasmática-tiempo (AUC) (25), siendo la relación AUC/CMI el parámetro farmacodinámico más predictor de la eficacia microbiológica. En un estudio previo realizado con ciprofloxacina se correlacionó el resultado clínico de la infección con el valor determinado para esta relación, demostrándose que un AUC/CMI < 125 se correlacionaba con un 60% de cultivos positivos tras dos semanas de tratamiento, AUC/CMI entre 125 y 250 se correlacionaba con un 25% de cultivos positivos después de 7 días de tratamiento, presentando la mayoría de los pacientes erradicación a los 14 días, y un AUC/CMI > 250 se correlacionaba con erradicación microbiológica tras 4 días de tratamiento o, lo que es lo mismo, AUC/CMI entre 125 y 250 predecían muerte bacteriana lenta, y AUC/CMI $>$

250, muerte bacteriana extremadamente rápida (115). Si se determina el valor de la relación $AUC_{0-24\text{h}}/CMI$ para rufloxacina y norfloxacina con los datos obtenidos en el ensayo Fase I realizado, se obtienen los mismos resultados que se obtenían analizando los títulos bactericidas: la relación $AUC_{0-24\text{h}}/CMI$ es menor de 125 para ambas quinolonas (87,27 versus 47,44 para *E. coli* y 21,82 versus 11,86 para *S. aureus* para rufloxacina y norfloxacina respectivamente), por lo que podemos concluir que su actividad sistémica es baja y no deben ser antimicrobianos de elección en el tratamiento de ese tipo de infecciones.

Analizando la actividad bactericida en orina, los títulos bactericidas fueron determinados análogamente a los títulos séricos, utilizando la orina basal de cada voluntario con 20% de caldo Isosensitest como medio para dilución, para asemejar en lo posible las condiciones in vivo, siendo también en este caso despreciable la actividad intrínseca de la orina por ser el título basal $< 1:2$. Los títulos determinados corroboran lo descrito anteriormente con los niveles, demostrándose una actividad bactericida alta y sostenida con rufloxacina tanto frente a *E. coli* como a *S. aureus*, siendo en cualquiera de los tiempos determinados mayor de 1:4, que como ya vimos en la introducción, en un estudio previo (41) se correlacionó este título con curación clínica en al menos el 90% de los pacientes que presentaban dicha actividad bactericida. Rufloxacina presentó unos títulos 16 veces superiores (4 diluciones) a 1:4 a lo largo de las 72 horas de toma de muestra frente a *E. coli* y títulos 4 veces superiores (2 diluciones) durante el mismo periodo frente a *S. aureus*. Si se analiza el área bajo la curva de títulos bactericidas de orina (AUBC), que es un índice de los efectos farmacodinámicos de un antimicrobiano (49) al integrar la actividad bactericida in vitro con el perfil farmacocinético del fármaco, los valores de AUBC en orina de rufloxacina son superiores a los de norfloxacina a pesar de las diferencias entre las CMBs de norfloxacina y rufloxacina (la CMB de norfloxacina es ocho veces menor para *E. coli* y cuatro veces menor para *S. aureus*). La explicación de estos altos valores de AUBC para rufloxacina se debe basar en los altos y mantenidos niveles en orina.

Los títulos bactericidas teóricos y experimentales concuerdan en el caso de norfloxacin frente a las dos cepas ensayadas y en el caso de rufloxacin frente a *S. aureus*. Es importante señalar que el diseño cruzado del estudio, la utilización de métodos estandarizados con los mismos microorganismos, y la utilización de la orina pretratamiento del propio voluntario en el medio de dilución de la orina problema del mismo voluntario, pueden haber contribuido a la obtención de esta predicción. Sin embargo los títulos experimentales de rufloxacin frente a *E. coli* fueron superiores a los esperados. La explicación de este hecho puede deberse a la presencia en orina de un metabolito activo de rufloxacin, el N-desmetil derivado. Este metabolito se encuentra en orina a concentraciones bajas (alrededor de 5 µg/ml) (50, 92), presentando una actividad similar a rufloxacin frente a *E. coli* y una actividad alrededor de ocho veces menor que ésta para *S. aureus* (106). Aunque se encuentre en orina a concentraciones subinhibitorias, su acción puede incrementar la acción de rufloxacin frente a *E. coli*, lo que no ocurriría frente a *S. aureus* por presentar menor actividad, aunque a pesar de ello, los títulos experimentales de rufloxacin frente a *S. aureus* fueron superiores a los teóricos determinados, demostrándose también una adición entre rufloxacin y su metabolito frente a *S. aureus* (aunque menor que la obtenida frente a *E. coli*).

La diferencia significativa en la razón título experimental/teórico de rufloxacin versus norfloxacin refuerza la sospecha de la contribución del metabolito de rufloxacin a la actividad de ésta. El AUBC puede utilizarse también para evaluar el efecto de la combinación de dos antimicrobianos, definiéndose sinergismo como un AUBC para la combinación significativamente superior al AUBC de cada uno de los dos antimicrobianos aislados (116). Las diferencias significativas entre el AUBC experimental y teórico de rufloxacin pueden atribuirse por tanto al metabolito activo, aunque exista una dilución progresiva en el método de determinación de la actividad bactericida que puede minimizar este efecto en el caso de antimicrobianos concentración-dependiente (116).

Otro análisis de las AUBCs obtenidas en este estudio podría hacerse desde el punto de vista de susceptibilidad in vitro. En este caso, la actividad bactericida ex vivo debería

seguir la misma proporción que la actividad bactericida in vitro, es decir, si las CMBs determinadas in vitro para rufloxacina frente a *E. coli* y *S. aureus* fueron respectivamente 2 y 4 µg/ml (proporción de actividad: 2:1), las AUBCs frente a *E. coli* y *S. aureus* deberían seguir esa proporción como ocurre con las AUBCs teóricas determinadas (1.116 para *E. coli* versus 558 para *S. aureus*). Sin embargo esta proporción no se mantiene con las AUBCs experimentales de rufloxacina (4.116 para *E. coli* versus 1.096 para *S. aureus*), donde la proporción pasa a ser 4:1. Esto indica nuevamente la adición de la acción de concentraciones subinhibitorias del metabolito a la actividad de rufloxacina. En el caso de norfloxacin, la proporción *E. coli*:*S. aureus* de la actividad bactericida in vitro (4:1) se mantiene considerando las AUBCs experimentales y teóricas.

En la determinación de los títulos teóricos se ha utilizado los niveles de antimicrobiano determinados por método biológico, sin embargo se ha considerado que estos niveles correspondían siempre a rufloxacina (a pesar de que el metabolito activo debía estar presente en la orina de los voluntarios sanos tras una dosis de rufloxacina), ya que el método de difusión utilizado para la determinación de niveles no permite la detección de sinergismo (117, 118). En los tests de difusión en agar, existe una correlación entre la zona de inhibición en el agar y la actividad del antimicrobiano (118), siendo la distancia al pocillo que se alcanza con una determinada concentración proporcional a la concentración de antimicrobiano en el pocillo (117). Sin embargo si se ponen dos antimicrobianos en un pocillo, el halo de inhibición siempre refleja la actividad del antimicrobiano más activo de los dos presentes, por lo que no es posible ver sinergismo en este test (118). En el estudio de rufloxacina se puede considerar que existen dos antimicrobianos en el pocillo: rufloxacina y su metabolito activo y, aunque ambos presentan igual actividad frente a *E. coli* que fue el microorganismo utilizado para la lectura, se puede considerar predominante a rufloxacina puesto que se encuentra en cantidades ocho veces superiores a las del metabolito (40 µg/ml para rufloxacina -según los datos obtenidos en el ensayo Fase I- versus 5 µg/ml para el metabolito -de acuerdo con bibliografía (92)-).

Los resultados obtenidos en este estudio de predicción de actividad bactericida en orina tienen importantes implicaciones si se considera que las diferencias entre la actividad experimental y teórica determinadas pueden aportar una justificación de discordancias entre actividad in vitro y resultados clínicos observados. Frente a *E. coli* ambas quinolonas presentan unos títulos mayores de 1:10 al menos durante 24 horas tanto desde el punto de vista experimental como teórico. Sin embargo, frente a *S. aureus*, norfloxacinina teóricamente presenta unos títulos superiores a ese punto de corte durante 16 horas (que por tanto cubrirían todo el intervalo de dosificación ya que éste es de 12 horas), pero experimentalmente se comprueba que esto sólo ocurre durante 8 horas (no cubriéndose por tanto en la realidad el intervalo de dosificación). En el caso de rufloxacinina ocurre lo contrario, los títulos teóricamente no estarían nunca frente a *S. aureus* por encima del punto de corte 1:10 y, sin embargo experimentalmente se demuestra que se alcanzan títulos superiores (1:16) durante al menos 72 horas. Por lo tanto, en el caso de norfloxacinina se sobreestimaría la actividad frente a *Staphylococcus*, estableciendo intervalos de dosificación que no cubrirían este género y podrían ser responsables de la menor eficacia observada con esta quinolona frente a *S. saprophyticus* cuando se administra como dosis única (99) y, respecto a rufloxacinina, se subestimaría su actividad ya que desde el punto de vista experimental, con una sola dosis, cubriría tres días de actividad frente a los dos microorganismos utilizados a pesar de que teóricamente sólo cubriría a *E. coli*. Teniendo en cuenta estos resultados de actividad bactericida, la dosis a ensayar en el estudio Fase III en ITU fue la misma del ensayo Fase I para rufloxacinina (400 mg en dosis única), utilizándose la pauta de norfloxacinina registrada (400 mg /12h durante 3 días). Como ya se ha comentado los resultados microbiológicos obtenidos en el ensayo Fase III confirmaron la buena actividad de ambas quinolonas con estas pautas de dosificación, aunque los títulos bactericidas determinados fueron inferiores a los del ensayo Fase I con las dos quinolonas, debido a que el intervalo de toma de muestra fue posterior al último determinado en el ensayo Fase I (72-84 horas versus 60-72 horas en el ensayo Fase I) y a que el microorganismo utilizado en cada determinación en el ensayo en ITU era el microorganismo aislado en cada paciente, habiendo por tanto una variabilidad entre las cepas de *E. coli*. Con las dos quinolonas, los títulos determinados cubren los intervalos de dosificación establecidos frente a *E.*

coli, no teniéndose información suficiente cuando *S saprophyticus* fue el microorganismo aislado por ocurrir esto en un bajo número de casos, lo que no permite valorar la predicción realizada frente al género *Staphylococcus*.

En este ensayo Fase III también se observa una dicotomía entre el índice terapéutico determinado y los títulos bactericidas ya que éstos últimos no difieren en gran medida entre rufloxacina y norfloxacina, mientras que la diferencia de índices terapéuticos es aproximadamente diez veces mayor para norfloxacina (como corresponde a su mayor actividad in vitro). Esta dicotomía puede ser también un reflejo de la mayor actividad bactericida de rufloxacina in vivo debido a la presencia del metabolito activo en orina.

La eficacia demostrada por rufloxacina en cistitis no complicadas no se repitió en el ensayo realizado en uretritis gonocócicas, demostrando en este último estudio además de fracaso clínico y microbiológico, una inducción in vivo de resistencia en las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas. La explicación de este hecho no puede basarse en el índice terapéutico alcanzado en suero que, como se describe en la introducción, debe ser de al menos 10 para asegurar la erradicación bacteriana y la aparición de resistencias, ya que considerando los niveles en el pico sérico alcanzados en el ensayo Fase I con la misma dosis (aproximadamente 5 µg/ml) y las CMI de rufloxacina de las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en los pacientes incluidos (0,25 µg/ml), se puede comprobar que el índice terapéutico es aproximadamente dos veces superior al necesario.

Por otra parte, hay que considerar que diversos estudios han demostrado la penetración intracelular de *N. gonorrhoeae* tanto en neutrófilos como en células del epitelio uretral (119, 120) y considerando que la capacidad de penetración de los distintos antimicrobianos es diferente, puede ser este uno de los criterios claves para la predicción de eficacia. Por ello, las concentraciones bactericidas de suero pueden no predecir eficacia frente a microorganismos intracelulares facultativos como *N. gonorrhoeae* (121). Sin embargo las fluoroquinolonas son un grupo de antimicrobianos que se caracteriza por presentar una alta penetración intracelular tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, con cocientes concentración intracelular/extracelular de 4-12 (122, 123), lo

que unido al amplio espectro antimicrobiano, la buena biodisponibilidad y la larga semivida, explicaría la buena eficacia demostrada por este grupo de antimicrobianos en el tratamiento de la infección gonocócica con dosis única (77, 78, 124, 125). En el caso de rufloxacina, los datos recogidos de los estudios de penetración intracelular realizados con células fagocíticas y no fagocíticas demuestran una buena penetración de rufloxacina, aunque menor de la observada con otras quinolonas ya que el cociente intracelular/extracelular es de 3 (126), siendo esta penetración superior en el caso de células fagocíticas como ocurre en el resto de quinolonas.

Estudio farmacodinámicos in vitro previos realizados con quinolonas (127, 128) han demostrado que durante la exposición bacteria-antimicrobiano, se produce una aparición de subpoblaciones resistentes que son inicialmente pequeñas ($<10^3$) pero que en algunos casos resultan ser las predominantes tras 24 horas de exposición. La presencia de altas concentraciones de antimicrobiano retrasan el tiempo de aparición de subpoblaciones resistentes, presumiblemente debido a que eliminan mayor número de mutantes resistentes (incluso aquellos con las CMIs más altas) de la pequeña subpoblación altamente resistente (129). Estos estudios sientan bases para la utilización terapéutica de dosis altas de quinolonas o dosis que proporcionen altas concentraciones de estos antimicrobianos.

En el caso de *N. gonorrhoeae* la diana principal de las quinolonas es la girasa (130), formándose el complejo quinolona-girasa-DNA que va seguido de una rápida, reversible inhibición de la síntesis de DNA, cese del crecimiento, e inducción de la respuesta SOS (130). Una de las consecuencias de la respuesta SOS es la mutagénesis inducida por las quinolonas y ésta puede ser importante si contribuye a la adquisición de resistencia a quinolonas (130), lo que se corresponde con la mutación encontrada en el gen *gyrA* que codifica la subunidad A de este enzima y una ausencia de mutación en el gen *parC* que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV. La mutación en el gen *gyrA* induce una resistencia moderada mientras que las mutaciones dobles en el *gyrA* y *parC* inducen una alta resistencia (130).

La resistencia ocurrida en el ensayo en uretritis gonocócica podría basarse en la concentración intracelular alcanzada de rufloxacin, que sería capaz de inducir la respuesta SOS (que daría lugar a la mutagénesis que produjo la resistencia), no lográndose alcanzar niveles suficientemente altos que produjeran la lisis celular como consecuencia de la liberación de trozos sueltos de DNA de los complejos de la girasa (130). Por otro lado, es necesario también considerar las diferencias de letalidad existentes entre las distintas quinolonas, ya que se ha demostrado que ciprofloxacina y quinolonas C-8 metil derivados son capaces de liberar subunidades de complejo DNA-girasa en mayor medida que otras como norfloxacina (130, 131), lo que las hace particularmente letales, aunque existen otros autores que indican que no existe correlación entre la cantidad de hebras de DNA liberado y la muerte bacteriana producida (132). Las diferencias de letalidad de unas quinolonas a otras podría estar de acuerdo con la idea de que no todas las quinolonas presentarían el mismo mecanismo de acción como se creyó en un principio (133). En este sentido podría ser que el mecanismo de acción de rufloxacin fuera más parecido al de norfloxacina (puesto que no se trata de un C8-metil derivado) por lo que sería un compuesto que presentara una menor capacidad de liberación de trozos de DNA de los complejos, lo cual se traduciría en una menor letalidad con respecto a otras quinolonas.

La inducción de resistencias in vivo no sólo afectó a rufloxacin sino que fue cruzada con otras quinolonas y por un mecanismo no conocido afectó también a tetraciclinas.

4- Indicaciones resultantes/Utilización en clínica

El programa de desarrollo de un antimicrobiano es obtener información con la que poder evaluar la eficacia clínica y seguridad del fármaco, estableciendo las patologías en las que la utilización del antimicrobiano en estudio representa una ventaja respecto al estándar habitualmente utilizado. En todos los ensayos realizados con rufloxacin (excepto en el ensayo de uretritis gonocócica que se diseñó con control histórico de acuerdo con la normativa FDA/IDSA), el fármaco control utilizado fue norfloxacina, fármaco estándar

en el tratamiento de ITU, por presentar buena actividad frente a uropatógenos y baja actividad sistémica (como cabía esperar de rufloxacina).

La dosis de rufloxacina estudiada en el ensayo Fase I (400 mg) demostró unas características farmacocinéticas y farmacodinámicas idóneas para cubrir al menos tres días de actividad bactericida en orina después de la administración de una dosis única, por lo que fue la dosis utilizada en el estudio de eficacia de rufloxacina en cistitis no complicadas. Este ensayo se realizó de acuerdo con la normativa IDSA/FDA, cumpliéndose las condiciones exigidas por ésta para considerar adecuado un nuevo régimen de dosificación de un antimicrobiano:

- 1- Tamaño de la muestra ≥ 150 pacientes
- 2- Al menos el 50% de las pacientes incluidas deben tener un cultivo inicial con $> 10^5$ ufc/ml de un uropatógeno.
- 3- Más del 75% de las pacientes deben presentar erradicación microbiológica y curación clínica en el control realizado a los 5-9 días (primer control).
- 4- Al menos el 50% de las pacientes que acudieron al primer control deben acudir a la visita de seguimiento a largo plazo 4-6 semanas después del tratamiento
- 5- Más del 65% de las pacientes que acuden a la visita de seguimiento a largo plazo deben presentar curación clínica y microbiológica.

En el ensayo realizado, el 71% de las pacientes incluidas presentaba un recuento bacteriano en el cultivo inicial $> 10^5$ ufc/ml, por lo que los resultados fueron obtenidos en una mayoría de pacientes que presentaban el criterio más estricto de definición de ITU (18), aunque no se observó diferencias de eficacia estratificando a las pacientes de acuerdo con el recuento inicial en dos grupos $> 10^5$ ufc/ml y $< 10^5$ ufc/ml, lo que está de acuerdo con lo hallado por otros autores que demuestran además que en la mayoría de casos, los recuentos bajos se convierten en recuentos altos si no se aplica tratamiento antimicrobiano (134).

Si se analiza los resultados de eficacia clínica obtenidos en este ensayo, se observa una discordancia entre sintomatología y hallazgos microbiológicos. En el grupo de norfloxacina, en la primera visita control hay un 1% de fracasos microbiológicos versus un 4% de fracasos clínicos; esto no se observó con rufloxacina en esta visita (6% versus 6,1%). Esta discordancia puede deberse a que en algunos casos los síntomas persisten varios días después de la erradicación bacteriana (97), hasta un máximo de 3 días después de la erradicación (135), cifrándose en un 20% los casos de pacientes que presentan remisión tardía en cada pauta de tratamiento (97). En la visita a largo plazo, las cifras fueron 8% fracasos clínicos versus 5% fracasos microbiológicos para rufloxacina y 7% versus 4% respectivamente para norfloxacina. Por tanto los fracasos clínicos fueron superiores a lo que cabría esperar de los resultados microbiológicos.

En todos las recurrencias observadas, el microorganismo aislado fue sensible al antimicrobiano aplicado por lo que se puede concluir que, a diferencia de lo que ocurrió en el tratamiento de uretritis gonocócica, no se produjo ningún caso de desarrollo de resistencia in vivo. Esto es importante teniendo en cuenta las últimas cifras de resistencia a quinolonas de *E. coli* en nuestro país que son de aproximadamente el 20% (136, 137), aunque cabe señalar que la selección de resistencias ocurre principalmente en tratamientos de ITU complicada o recurrente (138, 139). En este estudio, al excluirse las pacientes con complicaciones urológicas y aquellas con historia de ITU recurrente y, al tratarse de cistitis no complicadas con altos niveles en orina de ambas quinolonas, se excluían posibilidades de resistencias previas o de desarrollo de resistencia durante el tratamiento.

Por tanto, de los resultados obtenidos en este ensayo cabe concluir que ambas quinolonas presentaron buena eficacia en el tratamiento de cistitis no complicadas. En relación al perfil de seguridad de ambas quinolonas, cabe destacar que el ensayo no fue doble ciego, por lo que las pacientes conocían el tratamiento aplicado en cada caso. Esto puede haber influido en la comunicación de acontecimientos adversos en uno y otro grupo, ya que el porcentaje con norfloxacina fue algo inferior (12%) al encontrado en publicaciones previas (19%) con el mismo régimen de dosificación (102). Asimismo en

este ensayo no hubo ningún acontecimiento relacionado con el sistema nervioso central (SNC) en el grupo de norfloxacin, aunque han sido comunicados en estudios previos (95, 102, 104) y es un tipo de acontecimiento adverso que se conoce con todas las fluoroquinolonas (140). Por el contrario con rufloxacin el porcentaje de acontecimientos adversos fue similar al encontrado por otros autores (20% versus 14-21%) después de distintas pautas de tratamiento (141-143). Esta cifra está altamente influenciada por el porcentaje de acontecimientos relacionados con el SNC (12% pacientes), cifra similar a la encontrada en otro ensayo (13%) (141) pero superior a la de otro en donde sólo se comunicaron cinco casos entre 127 pacientes tratados durante 10 días con rufloxacin (142).

En consecuencia, el programa de desarrollo de rufloxacin centrado en las infecciones genitourinarias demostró que rufloxacin en dosis única de 400 mg era tan activa como la pauta estándar de 3 días con norfloxacin 400 mg/12h en el tratamiento de la cistitis no complicada, pero sin embargo fracasó desde el punto de vista clínico y microbiológico en el tratamiento de la uretritis gonocócica, produciendo además un desarrollo de resistencias in vivo. Basado en su espectro antimicrobiano (buena actividad frente a *E. coli* y baja actividad frente a anaerobios), la concentración alcanzada en heces, y la decontaminación selectiva (demostradas estas dos últimas en el ensayo Fase I), puede ofrecer ventajas en la prevención de recurrencias en ITU. Lógicamente no se realizaron ensayos posteriores para el tratamiento de otras ETS tras el fracaso en gonococia.

CONCLUSIONES

1 Los parámetros farmacodinámicos que relacionan los datos farmacocinéticos obtenidos tras la administración de una dosis única de rufloxacina y norfloxacina con los datos de susceptibilidad *in vitro*, demuestran que ninguna de las dos quinolonas es válida para el tratamiento de infecciones sistémicas.

2 Rufloxacina alcanza unos niveles en orina de aproximadamente 40 µg/ml tras una dosis única de 400 mg que se mantienen durante al menos 72 horas tras la administración oral de la dosis, lo que la hacen indicada para su estudio en monodosis en el tratamiento de cistitis no complicadas.

3 La eficacia clínica y microbiológica en cistitis no complicada en mujeres alcanzada con rufloxacina 400 mg dosis única fue igual a la obtenida por la pauta estándar de norfloxacina de 400 mg/12 horas durante tres días de tratamiento. Los datos farmacocinéticos determinados avalan esta determinación de eficacia por encontrarse iguales niveles de ambas quinolonas en la orina de 12 horas recogida tras 72 horas de la administración de rufloxacina o tras 12 horas de la última dosis de norfloxacina, así como la similar actividad bactericida urinaria a pesar de las diferencias de susceptibilidad de los aislamientos iniciales.

4 Se demuestra en el ensayo de Fase I un efecto paradójico *ex vivo* de norfloxacina por presentar mayor actividad la orina recogida 8-12 horas tras la administración de una dosis única de 400 mg que la orina recogida en el intervalo 0-2 horas que presenta unos niveles al menos 4 veces superiores.

5 La actividad bactericida de la orina determinada en el ensayo Fase I con rufloxacina fue superior a la esperada teóricamente probablemente debido a la presencia de un metabolito, que aun en bajas concentraciones en orina, actúa sinérgicamente con la molécula madre. Por el contrario la actividad de norfloxacina en orina calculada fue superior a la determinada experimentalmente frente a *S. aureus*. Por tanto el cálculo teórico de la actividad antibacteriana a lo largo del tiempo no parece adecuado ya que en

el caso de rufloxacina la actividad estaría infravalorada mientras que en el de norfloxacina estaría, por el contrario, sobrevalorada.

6 Las relaciones establecidas entre las distintas áreas bajo la curva de actividad bactericida en orina teóricas y experimentales permitió demostrar el sinergismo entre rufloxacina y su metabolito confirmándose la posibilidad de utilizar este parámetro para evaluar el efecto de la combinación de dos antimicrobianos y la sospecha de un metabolito activo.

7 Los niveles de rufloxacina determinados en heces hasta 7 días después de una dosis única, junto con su actividad frente a *E. coli* y su falta de actividad frente a anaerobios podrían presentar una ventaja para esta quinolona al disminuir la probabilidad de recurrencias tempranas en cistitis y hacerla potencialmente útil para la decontaminación selectiva del tracto gastrointestinal.

8 Se demostró fracaso microbiológico y clínico de rufloxacina 400 mg en el tratamiento de uretritis gonocócica en varones que se correlacionó con la demostración de desarrollo de resistencias in vivo durante el tratamiento.

9 Existen factores que no se incluyen en la relación de parámetros farmacocinéticos y susceptibilidad in vitro como son la existencia de metabolitos activos, el efecto paradójico ex vivo y la existencia o no de concentración dependencia en las curvas de muerte bacteriana, que pueden hacer sobrevalorar o infravalorar la actividad microbiológica ex vivo a lo largo del tiempo (al no coincidir con la determinada experimentalmente), lo que podría inducir al establecimiento de intervalos de dosificación no adecuados desde el punto de vista de eficacia o de desarrollo de resistencias.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Beam Jr. TR, Gilbert DN, and Kunin CM. General Guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drugs products. En R. T. Beam. Jr., D. N. Gilbert and C. M. Kunin (eds.), Guidelines for the evaluation of anti-infective drug products. IDSA/FDA. Clin. Infect. Dis. 1992; 15 (Suppl. 1): S5-S32.
- 2.- Preface: IDSA. En R. T. Beam. Jr., D. N. Gilbert and C. M. Kunin (eds.), Guidelines for the evaluation of anti-infective drug products. IDSA/FDA. Clin. Infect. Dis. 1992; 15 (Suppl. 1): S1-S2.
- 3.- Christ W. Regulatory requirements for clinical evaluation of antimicrobial agents. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1990; 9: 537-541.
- 4.- Thrupp LD, Cleeland R, Jones RN *et al.* General guidelines for clinical bacteriology. En R. T. Beam. Jr., D. N. Gilbert and C. M. Kunin (eds.), Guidelines for the evaluation of anti-infective drug products. IDSA/FDA. Clin. Infect. Dis. 1992; 15 (Suppl. 1): S339-S346.
- 5.- British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party. A guide to sensitivity testing. J. Antimicrob. Chemother. 1991; 27 (Suppl. D): 22.
- 6.- Gilbert DN. Guidelines for evaluating new antimicrobial agents. J. Infect. Dis. 1987; 156: 934-941.
- 7.- Applied Clinical Trials. 1997; 6: 18-47.
- 8.- Norrby SR. Clinical trials of antibiotics: toward improved quality and international standardization. The Antimicrobic Newsletter 1990; 7: 57-63.
- 9.- Baquero F. From accuracy towards truth: the BSAC Working Party's guide to sensitivity testing. J. Antimicrob. Chemother. 1991; 27: 701-702.

- 10.- Rubin RH, Beam Jr. TR, Stamm WE. An approach to evaluating antibacterial agents in the treatment of urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 1992; 14 (Suppl. 2): S246- S251.
- 11.- Rubin RH, Shapiro ED, Andriole VT, Davis RJ, and Stamm WE. General Guidelines for the evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. En R. T. Beam. Jr., D. N. Gilbert and C. M. Kunin (eds.), *Guidelines for the evaluation of anti-infective drug products. IDSA/FDA. Clin. Infect. Dis.* 1992; 15 (Suppl. 1): S216-S227.
- 12.- Warren JW. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. En Mobley HLT, Warren JW (eds), *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. American Society for Microbiology, Washington DC, 1996: p. 3-27.*
- 13.- Johnson JR. Treatment and prevention of urinary tract infections. En Mobley HLT, Warren JW (eds), *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. American Society for Microbiology, Washington DC, 1996: p. 95-118.*
- 14.- Johnson JR, Stamm WE. Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. *Ann. Intern. Med.* 1989; 111: 906-917.
- 15.- Johnson JR, Roberts P, Stamm WE. P fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patient's characteristics. *J. Infect. Dis.* 1987; 156: 225-229.
- 16.- Nicolle LE. Measurement and significance of antibiotic activity in the urine. En Lorian V (ed), *Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1996, p 793-812*

- 17.- Eisenstadt J, Washington JA. Diagnostic microbiology for bacteria and yeasts causing urinary tract infections. En Mobley HLT, Warren JW (eds), Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. American Society for Microbiology, Washington DC, 1996: p. 29-66.
- 18.- Kunin CM. Guidelines for the evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection: Additional considerations. Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 1041-1044.
- 19.- Sobel JD, Kaye D. Urinary tract infections. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and practice of infectious diseases, 4^a ed. Churchill Livingstone Inc. 1995; p: 662-690
- 20.- Handsfield HH, McCutchan JA, Corey L, Ronald AR. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of uncomplicated gonorrhea in adults and adolescents. En R. T. Beam. Jr., D. N. Gilbert and C. M. Kunin (eds.), Guidelines for the evaluation of anti-infective drug products. IDSA/FDA. Clin. Infect. Dis. 1992; 15 (Suppl. 1): S123-S130.
- 21.- Amsterdam, D. The MIC: Myth and reality. The Antimicrobial Newsletter 1992; 8: 9-16.
- 22.- Greenwood D. Predicting efficacy from in vitro tests: Unconventional in vitro tests. En O'Grady FW, Percival A (eds), Prediction and assessment of antibiotic clinical efficacy, Academic Press Inc, London 1986; p. 5-25.
- 23.- Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En Lorian V (ed), Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1996, p 52-111.

- 24.- Hindler JA, Thrupp LD. Interpretive guidelines for antimicrobial susceptibility test results: what do they mean?. *Clin. Microbiol. Newsletter* 1989; 11: 129-134.
- 25.- Drusano GL. Pharmacology of anti-infective agents. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and practice of infectious diseases*, 4^a ed. Churchill Livingstone Inc. 1995; p: 225-233.
- 26.- Schentag JJ, Nix DE, Forrest A. Pharmacodynamics of the fluoroquinolones. En Hooper DC, Wolfson JS (eds), *Quinolone antimicrobial agents*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1993: p. 259-271.
- 27.- Barriere SL, Ely E, Kapusnik JE, Gambertoglio JG. Analysis of a new method for assessing activity of combinations of antimicrobials: area under the bactericidal activity curve. *J. Antimicrob. Chemother.* 1985; 16: 49-59.
- 28.- Wolfson JS, Swartz MN. Serum bactericidal activity as a monitor of antibiotic therapy. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312: 968-975.
- 29.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Methodology for the Serum Bactericidal Test. Proposed guidelines. Tentative Standards M21-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- 30.- Klastersky J. The bactericidal activity in serum and its prognostic clinical value. *Infection* 1983; 11 (Suppl. 2): S93-S96.
- 31.- Drusano G, Standiford H, Ryan P, McNamee W, Tatem B, Schimpff S. Correlation of predicted serum bactericidal activities and values measured in volunteers. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1986; 5: 88-92.
- 32.- Stamey TA, Fair WR, Timothy MM *et al.* Serum versus antimicrobial concentrations in case of urinary test infections. *N. Engl. J. Med.* 1974; 291:1159-1163.

- 33.- Anderson JD. The relevance of urine and serum antibacterial activity in the treatment of urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 1976; 2: 226-228.
- 34.- McCabe WR, Jackson GG. Treatment of pyelonephritis: bacterial, drug and host factors in success or failure among 252 patients. *N. Engl. J. Med.* 1965; 272: 1037-1044.
- 35.- Naumann P. The value of antibiotic levels in tissue and in urine in the treatment of urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 1978; 4: 9-17.
- 36.- Soriano F. Optimal dosage of β -lactam antibiotics: time above the MIC and inoculum effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992; 30: 566-569.
- 37.- Shibl AM. Effect of antibiotics on adherence of micro-organisms to epithelial cell surfaces. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7: 51-65.
- 38.- Ben Redjeb SA, Glim A, Horchani A, Zmerilli S, Boujnak ALV. Effects of 10 milligrams of ampicillin per day on urinary infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 22: 1084-1086
- 39.- Nicolle LE, Ronald AR. Recurrent urinary tract infection in adult women: diagnosis and treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1987; 1: 793-806.
- 40.- Kowalsky SF, Echols RM, McCormick EM. Comparative serum bactericidal activity of ceftizoxime/metronidazol, ceftizoxime, clindamicin, and imipenem against obligate anaerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990; 25: 767-775.
- 41.- Klasterky J, Daneau D, Swings G, Weets D. Antibacterial activity in serum and in urine as a therapeutic guide in bacterial infections. *J. Infect. Dis.* 1974; 129: 187-193.

- 42.- Blaser J, Stone BB, Groner MC, Zinner SH. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31: 1054-1060.
- 43.- Norrby SR. Short-term treatment of uncomplicated urinary tract infections in women. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 12: 458-467.
- 44.- Peeling RW, Ronald AR. Use of quinolones in sexually transmitted diseases. En Hooper DC, Wolfson JS (eds), *Quinolone antimicrobial agents*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1993: p. 299-327.
- 45.- Handsfield HH, Ronald AR, Corey L, McCutchan JA. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of sexually transmitted chlamydial infections and related clinical syndromes. En R. T. Beam, Jr., D. N. Gilbert and C. M. Kunin (eds.), *Guidelines for the evaluation of anti-infective drug products*. IDSA/FDA. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15 (Suppl. 1): S131-S139.
- 46.- Mattina R, Cocuzza CE, Cesana M, Bonfiglio G. In vitro activity of a new quinolone, rufloxacin, against nosocomial isolates. *Chemotherapy* 1991; 37: 260-269.
- 47.- Ravizzola G, Pinsi G, Piralì F, Colombrita D, Foresti I, Peroni L, Turano A. Rufloxacin (MF-934): In vitro and in vivo antibacterial activity. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 1989; XV: 11-15.
- 48.- Segre G, Cerretani D, Cerri D, Moltoni L. A new tricyclic fluoroquinolone, rufloxacin (MF-934), with interesting antibacterial and pharmacokinetic characteristics. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 1988; XIV: 747-754.

- 49.- Segre G, Cerretani D, Moltoni L, Urso R. Plasma and urine pharmacokinetics of rifloxacin in healthy volunteers after single and multiple oral doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989; 36 (Suppl.): A 333.
- 50.- Imbimbo BP, Broccali G, Cesana M, Crema F, Attardo-Parrinello G. Inter- and intrasubject variabilities in the pharmacokinetics of rifloxacin after single oral administration to healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35: 390-393.
- 51.- Wise R, Johnson J, O'sullivan N, Andrews JM, Imbimbo P. Pharmacokinetics and tissue penetration of rifloxacin, a long acting quinolone antimicrobial agent. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991; 28: 905-909.
- 52.- Neuman M, Sogni P, Michojoulos S, Guerre J. Single dose therapy of lower urinary tract infections (UTI) with rifloxacin, a long-acting fluoroquinolone. 16th International Congress of Chemotherapy. Jerusalem, 1989, Proceedings p. 411.1-411.2.
- 53.- Bassetti D, Cruciani M, Danzi MC *et al.* Rifloxacin in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. 3rd International Symposium on New Quinolones. Vancouver, 1990, Abstract book p. 337, Abstract 270.
- 54.- Gómez-Lus ML, Barrientos S, Rubias JM, Heredia S, Giménez MJ, Prieto J. Comparative In-vitro Activity and Post-antibiotic Effect of Rifloxacin. En Einhorn J, Nord CE, Norrby SR (eds). *Recent Advances in Chemotherapy*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1994.
- 55.- Gómez-Lus ML, Barrientos S, Rubias JM, Heredia S, Giménez MJ, Prieto J. Comparative In-vitro Activity and Post-antibiotic Effect of Rifloxacin. Abstracts of the 18th International Congress of Chemotherapy (Stockholm, Sweden). Abstract no. 430, p:194. 1993.

- 56.- Balcabao IP, Jiménez de Anta MT, Salva P, Martin M, Marco F, Costa J, Giménez MJ, Aguilar L. Rufloxacin vs Norfloxacin: Serum, Urine and Fecal levels in volunteers. Abstracts of the 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Sevilla, Spain): Abstract nº 719, p:190. 1993.
- 57.- Balcabao IP, Aguilar L, Martin M, Costa J, Salvá P, Giménez MJ. Comparative Pharmacodynamics of 400 mg oral Rufloxacin vs Norfloxacin. Abstracts of the 18th International Congress of Chemotherapy (Stockholm, Sweden). Abstract nº 20, p:126. 1993.
- 58.- Costa J, Vedia C, Balcabao IP, García-Vicente JA, Montero J, Giménez MJ, Aguilar L, Salvá P. Farmacocinética de Rufloxacina en Comparación con Norfloxacina en Voluntarios Sanos. Abstract del XII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica (Cádiz, 1994).
- 59.- Gimenez MJ, Costa J, Aguilar L, Balcabao IP, Martin M, Prieto J, Dal-Ré R. Quinolone dosing for urinary tract infections, which are more appropriate pharmacokinetic or pharmacodynamic parameters?. European Congress of Chemotherapy. Abstract nº W 144. Glasgow, 14-17 May 1996.
- 60.- Giménez MJ, Aguilar L, Costa J, Dal-Ré R, Vedia C, Salvá P. Estimated versus experimental urinary antibacterial activity: implications for dosage. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology: 18 (suppl. C, 13th Congress of the Spanish Society of Clinical Pharmacology): 104. 1996.
- 61.- Aguilar L, Balcabao IP, Salvá P, Martín M, Costa J, Prieto J, Dal-Ré R. Ex vivo antibacterial properties of rufloxacin compared with those of norfloxacin in a study with healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 17-21.

- 62.- Aguilar L, Giménez MJ, Costa J, Dal-Ré R, Prieto J. Suspicion of quinolone active metabolite following discrepancy between predicted and experimental urine bactericidal activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 927-930.
- 63.- Balcabao IP, Martin M, Costa J, Giménez MJ, Salvá P and Aguilar L. Rufloxacin vs Norfloxacin: Urine Bactericidal Activity in Healthy Volunteers. Abstracts of the 18th International Congress of Chemotherapy (Stockholm, Sweden). Abstract n° 543, p: 213. 1993.
- 64.- Balcabao IP, Martin M, Gimenez MJ, Costa J, Solana P, Aguilar L, Prieto J. Rufloxacin (R) vs Norfloxacin (N): Urine Killing Rates (UKR₅). Phase I study. 6th International Congress for Infectious Diseases. Abstract N° 1219, p:378. Prague, April 26-30. 1994
- 65.- Marcos MA, Marco F, Jimenez de Anta MT, Gómez J, Vedia C, Gimenez MJ, Aguilar L. Rufloxacin vs Norfloxacin Effect on Fecal Flora. Phase I Study. 6th International Congress for Infectious Diseases. Abstract N° 1216, p:377. Prague, April 26-30. 1994.
- 66.- Marco F, Giménez MJ, Jiménez de Anta MT, Marcos MA, Salva P, Aguilar L. Comparison of rufloxacin and norfloxacin effects on faecal flora. *J. Antimicrob Chemother* 1995; 35: 895-901.
- 67.- Del Rio G, Dalet F, Giménez MJ, Caffaratti J, Aguilar L. Single dose Rufloxacin vs three-day Norfloxacin treatment of uncomplicated cystitis. Urine bactericidal activity. First European Congress of Chemotherapy. Abstract n° W 143. Glasgow, 14-17 May 1996.
- 68.- Del Rio G, Dalet F, Aguilar L, Caffaratti J, Dal-Ré R. Single dose Rufloxacin versus 3-day Norfloxacin treatment of uncomplicated cystitis: clinical evaluation and pharmacodynamic considerations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 408-412.

- 69.- Vila J, Olmos L, Ballesteros J, Vazquez JA, Giménez MJ, Marco F, Aguilar L. Development of in vivo resistance after quinolone treatment of gonococcal urethritis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997; 39: 841.
- 70.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1985. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria which grow aerobically. Approved standard M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- 71.- Lauer BA, Masters HB. Toxic effect of calcium alginate swabs on *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 54-56.
- 72.- Perea EJ, Aznar Martin J. Chlamydia. En Doyma, SA, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Barcelona, 1992: 794-806.
- 73.- Catlin BW. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J Infect Dis* 1973, 128 :178-194
- 74.- Bygderman S. Polyclonal and monoclonal antibodies applied to the epidemiology of gonococcal infection. In Young H, Mc Millan A (eds). *Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases*. Marcel Dekker Inc., New York 1987: 117-165
- 75.- Vila J, Ruiz J, Marco F *et al.* Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 2477-2479.
- 76.- Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jiménez de Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 491-493.

- 77.- Aznar J, Prados R, Rodríguez-Pichardo A, Hernández I, De Miguel C, Perea EJ. Comparative clinical efficacy of two different single-dose Ciprofloxacin treatments for uncomplicated gonorrhoea. *Sex. Transm. Dis.* 1986; 13: 169-171
- 78.- Aznar J, Prados R, Herrera A, Rodríguez-Pichardo A, Perea EJ. Single doses of ofloxacin in uncomplicated gonorrhoea. *Drugs* 1987; 34 (Suppl. 1): 107-110.
- 79.- Cofsky RD, Du Bouchet L, Landesman SH. Recovery of norfloxacin in feces after administration of a single oral dose to human volunteers. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1984; 26: 110-111.
- 80.- Zeiler MJ, Beerman D, Wingender W, Förster D, Schaht P. Bactericidal activity of ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin in serum and urine after oral administration to healthy volunteers. *Infection* 1988; 16 (Supp 1): S19-S23.
- 81.- Krogstad DJ, Moellering Jr RC. Antimicrobial combinations. In V. Lorian (ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1988; 537-595.
- 82.- Holford N. MK model. An extended least squares modelling program. Elsevier Publisher, Amsterdam; 1986.
- 83.- Shumaker RC. PKCALC. A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metabol. Rev.* 1986; 17: 331-348.
- 84.- Reeves DS, Lacey RW, Mummery RV, Mahendra M, Bint AJ, Newsom SWB. Treatment of acute urinary infection by Norfloxacin or nalidixic acid/citrate: a multi-centre comparative study. *J. Antimicrob Chemother.* 1984; 13 (Suppl B): 99-105.
- 85.- Mattie H. Kinetics of antimicrobial action. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 19-27.

- 86.- Stratton CW. Susceptibility testing today: myth, reality and new direction. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1988; 9: 264-267.
- 87.- Greenwood D. Antimicrobial susceptibility testing: are we wasting our time?. *Br. J. Biomed. Sci.* 1993; 50: 31-34.
- 88.- Finch RG. In vitro antimicrobial susceptibility testing: does it really matter?. *J. Chemother* 1997; 9 (Suppl. 1): 3-6.
- 89.- Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989; 2: 378-424.
- 90.- Vree TB, Biggelaar-Martea M, Imbimbo BP. High performance liquid chromatography and preliminary pharmacokinetics of rifloxacin and its metabolites N-desmethylrifloxacin and rifloxacin sulfoxide in plasma and urine of humans. *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokin.* 1992; 17: 45-49.
- 91.- Phillips I, Baquero F, Bergan T, Degener J, Schito GC, Wiedemann B. European study group on antibiotic breakpoints. Breakpoint determination: rifloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12: 574-575.
- 92.- Kisicki JC, Griess RS, Ott CL *et al.* Multiple dose pharmacokinetics and safety of rifloxacin in normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36: 1296-1301.
- 93.- Pontzer RE, Krieger RE, Boscia JA, McNamee W, Levison ME, Kaye D. Single-dose cefonicid therapy for urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 23: 814-816.
- 94.- Tolkoff-Rubin EN, Weber D, Fang LST, Kelly M, Wilkinson R, Rubin RH. Single-dose therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole for urinary tract infection in women. *Rev. Infect. Dis.* 1982; 4: 444-448.

- 95.- Iravani A, Richard GA. Single-dose ceftriaxone versus multiple-dose trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of acute urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27: 158-161.
- 96.- Kunin CM. Duration of treatment of urinary tract infection. *Am. J. Med.* 1981; 71: 849-854.
- 97.- Kunin CM. Urinary tract infections in females. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18: 1-12.
- 98.- Iravani A. Multicenter study of single-dose and multiple-dose fleroxacin versus ciprofloxacin in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *Am. J. Med.* 94 (suppl. 3A): 89S-96S.
- 99.- Saginur R, Nicolle LE, Canadian Infectious Diseases Society Clinical Trials Study Group. Single-dose compared with 3-day norfloxacin treatment of uncomplicated urinary tract infection in women. *Arch. Intern. Med.* 1992: 1233-1237.
- 100.- Counts GW, Stamm WE, McKeivitt M, Running K, Holmes KK, TurckM. Treatment of cystitis in women with a single dose of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev. Infect. Dis.* 1982; 4: 484-490.
- 101.- Stamm WE., Hooton TM. Management of urinary tract infection in adults. *N. Eng. J. Med.* 1993; 329: 1328-1334.
- 102.- The inter-nordic urinary tract infection study group. Double-blind comparison of 3-day versus 7-day treatment with norfloxacin in symptomatic urinary tract infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 1988; 20: 619-624.
- 103.- Neringer R, Forsgren A, Hansson C, Ode B, and The south Swedish lolex study group. Lomefloxacin versus norfloxacin in the treatment of uncomplicated urinary tract

infections: three-day versus seven-day treatment. *Scand. J. Infect. Dis.* 1992; 24: 773-780.

104.- Piippo T, Pitkajarvi T, Salo SA. Three-day versus seven-day treatment with norfloxacin in acute cystitis. *Current Therapeutic Research* 1990; 47: 644-653.

105.- Norrby SR. Treatment of urinary tract infections with quinolone antimicrobial agents. En Hooper DC, Wolfson JS (eds), *Quinolone antimicrobial agents*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1993: p. 273-283.

106.- Wise R, Andrews JM, Matthews R, Wolstenholme M. The in vitro activity of two new quinolones: rufloxacin and MF 961. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992; 29: 649-660.

107.- Levison ME. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. Bactericidal and postantibiotic effects. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 1995; 9: 483-495.

108.- Phillips I, Culebras E, Moreno F, Baquero F. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 20: 631-638.

109.- Smith JT. Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *Pharm. J.* 1984; 233: 299-305.

110.- Hooper DC, Wolfson J. Mechanisms of quinolone action and bacterial killing. En Hooper DC, Wolfson JS (eds), *Quinolone antimicrobial agents*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1993: p. 273-283.

111.- Aguilar L, Esteban C, Frias J, Pérez-Balcabao I, Carcas AJ, Dal-Ré R. Cefminox: correlation between in-vitro susceptibility and pharmacokinetics and serum bactericidal activity in healthy volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994; 33: 91-101.

- 112.- Shinkai S, Ogawa T, Fujita M *et al.* The studies on assay method of MT-141 levels in biological fluids. *Chemotherapy (Tokio)* 1984; 32 (Suppl. 5): 59-66.
- 113.- Craig WA, Welling PG. Protein binding of antimicrobials: clinical pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin. Pharmacokinet.* 1977; 2: 252-268.
- 114.- Pien FD, Williams RD, Vosti KL. Comparison of broth and human serum as the diluent in the serum bactericidal test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1975; 7: 113-114.
- 115.- Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in serious ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 1073-1081.
- 116.- Stratton CW, Kooksey RC. Susceptibility Tests: Special tests. In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991, p: 1153-1165.
- 117.- Acar JF, Goldstein FW. Disk susceptibility test. In Lorian V (de), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1996, p: 1-51.
- 118.- Barry AL. Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In: Lorian V (ed). *Antibiotics in laboratory medicine*; The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1991: p 1-16.
- 119.- Apicella MA, Ketterer M, Lee FKN, Zhou D, Rice PA, Blake MS. The pathogenesis of gonococcal urethritis in men: confocal and immunoelectron microscopic analysis of urethral exudates from men infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 636-646.

- 120.- Ward ME, Watt PJ. Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to urethral mucosal cells: an electron microscopic study of human gonorrhoea. *J. Infect. Dis.* 1972; 126: 601-605.
- 121.- Phanucharas JP, Gorby GL. Differential intracellular efficacies of ciprofloxacin and cefixime against *Neisseria gonorrhoeae* in human fallopian tube organ culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1547-1551.
- 122.- Tulkens PM. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 1991; 10: 100-106.
- 123.- Perea EJ, García I, Pascual A. Comparative penetration of lomefloxacin and other quinolones into human phagocytes. *Am. J. Med.* 1992; 92 (Suppl. 4A): 48S-51S.
- 124.- Coker DM, Ahmed-Jushuf I, Arya OP, Chessbrough JS, Pratt BC. Evaluation of single dose ciprofloxacin in the treatment of rectal and pharyngeal gonorrhoea. *J. Antimicrob. Chemother.* 1989; 24: 271-272.
- 125.- Lutz FB Jr. Single-dose efficacy of ofloxacin in uncomplicated gonorrhoea. *Am. J. Med.* 1989; 87: 69S-74S.
- 126.- Bonina L, Arena A, Cesana M, Costa GB, Mastroeni F, Carbone M. Cellular uptake and activity of rifloxacin in different cell types and professional phagocytic cells. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1993; 2: 111-116.
- 127.- Dudley MN, Blaser J, Gilbert D, Zinner SH. Bactericidal activity of ciprofloxacin against *P. aeruginosa* and other bacteria in an in vitro two compartment capillary model. *Rev. Infect. Dis.* 1988; 10 (Suppl.): S34-S35.
- 128.- Dudley MN, Zinner SH. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the antipseudomonal activity of ciprofloxacin: importance of bacterial

subpopulations. In Program Abstr. 27th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 445., 1987.

129.- Bauernfeind A, Petermuller C, Heinrich B. Dependence of the bactericidal activity and mutant selection of 4-quinolones on their serum concentration levels. *Infection* 1986; 14 (Suppl.1): S26-S30.

130.- Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; 61: 377-392.

131.- Zhao XL, Xu C, Domagala J, Drlica K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 13991-13996.

132.- Lewin CS, Smith JT. DNA breakdown by the 4-quinolones and its significance. *J. Med. Microbiol.* 1990; 31: 65-70.

133.- Walters RN, Piddock LJ, Wise R. The effect of mutations in the SOS response on the kinetics of quinolone killing. *J. Antimicrob. Chemother.* 1989; 24: 863-873.

134.- Arav-Boger R, Leibovici L, Danon YL. Urinary tract infections with low and high colony counts in young women. *Arch. Intern. Med.* 1994; 154: 300-304.

135.- Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT. Consensus viewpoint on management of urinary infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994; 33 (Suppl. A): 147-153

136.- Torné J, Moner Ll. Fluoroquinolonas. *Medicina Integral* 1997; 30: 263-269.

137.- Ruiz J, Goñi P, Marco F, Jimenez de Anta T, Vila J. Detección de la resistencia a las quinolonas producida por mutaciones en la Ser-83 de la DNA-girasa mediante PCR y RFLP con *Hinf*I en *Escherichia coli*. *Rev Esp. Quimioter.* 1996; 9: 206-210.

- 138.- Petersen LR. Quinolone resistance in clinical practice: occurrence and importance, p. 119-137. In D.C. Hooper, J.S. Wolfson (eds), *Quinolone Antimicrobial Agents*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993.
- 139.- Deguchi T, Kawamura T, Yasuda M et al. In vivo selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1609-1611.
- 140.- Hooper D C, Wolfson JS. Adverse effects, p. 489-512. In D. C. Hooper and J. S. Wolfson (eds). *Quinolone Antimicrobial Agents*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993.
- 141.- Jardin A, Cesana M, and French Multicenter Urinary Tract Infection-Rufloxacin Group. Randomized, double-blind comparison of single-dose regimens of Rufloxacin and Pefloxacin for acute uncomplicated cystitis in women. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1995; 39:215-220.
- 142.- Krietman W, Cesana M, Rondel R, Focht J. Double-blind, comparative study of rufloxacin once daily versus amoxicillin three times a day in treatment of outpatients with exacerbations of chronic bronchitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 2298-2306.
- 143.- Mattina R, Cocuzza CE, Cesana M, and the Italian Multicentre UTI Rufloxacin Group. Rufloxacin once daily versus ofloxacin twice daily for treatment of complicated cystitis and upper urinary tract infections. *Infection* 1993; 21: 106-111.