
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE C.C. BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



***EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE AMINOGLICOSIDOS
Y FLUORQUINOLONAS ESPECIALMENTE RELACIONADO
CON SU ESTUDIO EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL***

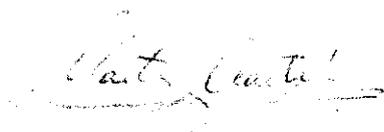
TESIS DOCTORAL

MARTA M^ª MARTÍN CAMINERO
MADRID, 1992

Dr. D. JOSE PRIETO PRIETO, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "EFECTO POSTANTIBIOTICO DE AMINOGLICOSIDOS Y FLUORQUINOLONAS ESPECIALMENTE RELACIONADO CON SU ESTUDIO EN LA EXPERIMENTACION ANIMAL" constituye la memoria presentada por Marta M^a Martín Caminero para aspirar al Grado de Doctor en C.C. Biológicas, y ha sido realizado integramente en los laboratorios de este departamento bajo mi dirección.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, Abril de mil novecientos noventa y dos.



Fdo. MARTA M^a MARTÍN CAMINERO



Fdo. José Prieto Prieto

Ante todo, mi agradecimiento más sincero al Prof. Prieto por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, por sus buenos consejos y el apoyo inestimable que ha supuesto durante la realización de este estudio.

A Fernando y Jesu, mis colegas de equipo y amigos con los que he compartido tantas horas de trabajo, por todo el entusiasmo que hemos puesto en investigar y sacar adelante este estudio. Deseo expresar también mi agradecimiento al Dr. Mínguez por sus acertadas revisiones.

A todos los compañeros del Departamento que de alguna forma han colaborado y me han animado en este trabajo, especialmente a Charo, Silvia, Carmen, Inma, Irene y Reyes.

A M^a Jesus, Pepi, Manuel, Roberto, Paco y Beatriz por brindarme su amistad y dejarme compartir con ellos mis aspiraciones.

Y por último, no quisiera olvidar mi agradecimiento a los sufridos roedores que han prestado su cuerpo por la ciencia y el hombre, con la esperanza de que su sacrificio no halla sido en vano.

A Gerar y a mis padres

NOTA:

Este trabajo ha sido realizado en un ordenador Amstrad PC3286 y editado en una impresora Hewlett-Packard LáserJet III.

Los programas utilizados han sido los siguientes:

- WordPerfect, Versión 5.1 (Procesador de texto)*
- Lotus 123, Versión 2 (Hoja de cálculo)*
- Estadist (Análisis estadístico)*
- Harvard Graphics, Versión 2.3 (Diseño de gráficos y figuras)*
- DBase III Plus (Base de datos)*

INDICE

I.	ABREVIATURAS.	1
II.	JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	3
III.	INTRODUCCION.	6
	1. ANTIMICROBIANOS	7
	1.1. Aminoglicósidos	9
	1.1.1. <i>Gentamicina</i>	13
	1.1.2. <i>Netilmicina</i>	14
	1.1.3. <i>Isepamicina</i>	16
	1.2. Quinolonas	17
	1.2.1. <i>Ciprofloxacino</i>	23
	1.2.2. <i>Fleroxacino</i>	24
	1.2.3. <i>Lomefloxacino</i>	26
	2. EFECTO POSTANTIBIOTICO	27
	2.1. <i>Definición del EPA</i>	28
	2.2. <i>Mecanismo del EPA</i>	29
	2.2.1. <i>Factores que afectan al EPA</i>	30
	2.3. <i>Determinación del EPA "in vitro"</i>	32
	2.3.1. <i>Eliminación del antimicrobiano</i>	32
	2.3.2. <i>Cuantificación del crecimiento bacteriano</i>	34
	2.3.3. <i>Cuantificación del EPA "in vitro"</i>	35
	2.4. <i>Determinación del EPA "in vivo"</i>	37
	2.4.1. <i>Modelos experimentales</i>	37
	2.4.2. <i>Cuantificación del EPA "in vivo"</i>	39
	2.5. <i>Significado biológico del EPA</i>	41
	2.5.1. <i>Aplicación clínica</i>	41
	2.5.2. <i>Otro efectos relacionados con el EPA</i>	41
IV.	MATERIAL Y METODO	45
	1. MATERIAL.	46
	1.1. <i>Microorganismos</i>	46
	1.2. <i>Antimicrobianos</i>	46
	1.3. <i>Animales</i>	47

1.4. Medios de cultivo	47
1.5. Otros productos y reactivos	48
1.6. Instrumental, aparatos y material fungible	48
2. METODO.	50
2.1. Estudios "in vitro"	50
2.1.1. Recuento de microorganismos	50
2.1.2. Calculo de CMI Y CMB	50
2.1.3. Evaluación del EPA: Técnica de dilución en caldo	51
2.1.4. Efecto bactericida	53
2.1.5. Efecto "in vitro" de las subCMI de lomefloxacino sobre <u>E.coli</u> en fase de EPA	53
2.2. Estudios "in vivo"	54
2.2.1. Evaluación del EPA: Modelo de infección en muslo de ratón neutropénico	54
2.2.2. Efecto bactericida	61
2.3. Análisis estadístico	62
V. RESULTADOS.	63
1. ESTUDIOS "IN VITRO"	64
1.1. CMI Y CMB	64
1.2. Efecto postantibiótico	64
1.3. Efecto bactericida	65
1.4. Efecto de las subCMI de lomefloxacino frente a <u>E.coli</u> en fase de EPA	65
2. ESTUDIOS "IN VIVO"	67
2.1. Rectas estándar	67
2.2. Curvas de concentración de antimicrobiano en suero de ratón neutropénico	68
2.3. Tiempo en que los niveles de antimicrobiano están por encima de la CMI	68

	2.4. Efecto postantibiótico	69
	2.5. Control de las concentraciones subinhibitorias en el EPA	70
	2.6. Efecto bactericida	70
VI.	TABLAS Y FIGURAS.	72
VII.	DISCUSION.	101
	1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS "IN VITRO"	102
	1.1. Evaluación del EPA "in vitro" de los aminoglicósidos .	102
	1.2. Evaluación del EPA "in vitro" de la fluorquinolonas . .	103
	1.3. Comparación con otros autores	104
	2. DISCUSION DE RESULTADOS "IN VIVO"	106
	2.1. Evaluación del EPA "in vivo" de los aminoglicósidos .	107
	2.2. Evaluación del EPA "in vivo" de las fluorquinolonas .	108
	2.3. Comparación con otros autores	112
	3. EVALUACION TOTAL DEL EPA "IN VITRO" E "IN VIVO" . .	114
	4. EVALUACION DEL MODELO EXPERIMENTAL	116
	4.1. Modelo "in vitro"	116
	4.2. Modelo "in vivo"	117
	5. EXTRAPOLACION A LA CLINICA HUMANA DEL EPA Y OTROS FACTORES EN LOS PROTOCOLOS DE DOSIFICACION	120
	5.1. Farmacocinética	120
	5.2. Resistencias	121
	5.3. Efecto PALE	122
	5.4. Efecto refractario	123
	5.5. Toxicidad	124
	6. LA DOSIFICACION UNICA EN LA TERAPIA ANTIMICROBIANA HUMANA	125
	6.1. Pacientes inmunocomprometidos	125
	6.2. Pacientes inmunocompetentes	126
VIII.	CONCLUSIONES.	128
IX.	BIBLIOGRAFIA.	131

I. ABREVIATURAS

<i>ABC</i>	<i>Area bajo la curva de concentración de antimicrobiano respecto al tiempo</i>
<i>ADN</i>	<i>Ac.desoxirribonucleico</i>
<i>ARN</i>	<i>Ac.ribonucleico</i>
<i>AS/V</i>	<i>Relación área de superficie / volumen</i>
<i>Cmáx</i>	<i>Concentración máxima de antimicrobiano en suero</i>
<i>CMB</i>	<i>Concentración mínima bactericida</i>
<i>CMI</i>	<i>Concentración mínima inhibitoria</i>
<i>EPA</i>	<i>Efecto postantibiótico</i>
<i>IM</i>	<i>Intramuscular</i>
<i>IV</i>	<i>Intravenoso</i>
<i>M-H</i>	<i>Müller-Hinton</i>
<i>PALE</i>	<i>Efecto postantibiótico leucocitario</i>
<i>PBPs</i>	<i>Proteinas fijadoras de penicilina</i>
<i>PMN</i>	<i>Leucocitos polimorfonucleares</i>
<i>SNC</i>	<i>Sistema nervioso central</i>
<i>UFC</i>	<i>Unidades formadoras de colonias</i>
<i>UD</i>	<i>Tratamiento de una dosis diaria</i>
<i>TD</i>	<i>Tratamiento de tres dosis diarias</i>

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El estudio de los fármacos antimicrobianos abarca un campo muy amplio que implican necesariamente al huésped y microorganismo, con muchas lagunas aún por resolver. Una de ellas es el efecto postantibiótico (EPA), definido como una supresión del crecimiento bacteriano tras una corta exposición a un agente antimicrobiano (133), y aunque este fenómeno fue observado en los años 40 (23, 55, 56, 154), hasta hace dos décadas (26, 29, 132, 201, 206) no había tenido la consideración y aplicaciones que hoy en día se conocen. La más importante es la posibilidad de espaciar las dosis de antimicrobiano en una terapia antiinfectiosa sin miedo a perder eficacia, reduciendo consecuentemente efectos secundarios tóxicos y costes médicos, además de facilitar la medicación al paciente (62, 144, 194, 197).

La investigación del EPA requiere una estandarización de las técnicas para valorarlo. En este sentido los trabajos "in vitro" (6, 23, 29, 100, 122, 132, 133, 135, 164) se encuentran más adelantados que los "in vivo". En los primeros existen varias técnicas, algunas más utilizadas que otras, pero los criterios de supresión del crecimiento bacteriano, exposición al antibiótico y evaluación del EPA, son comparables y los datos coherentes. No sucede lo mismo con los modelos experimentales animales (90, 148, 162, 173, 203) que además de encontrar menos estudios, quizá por su mayor complicación y laboriosidad, los resultados son más variables y las técnicas muy distintas. En este trabajo se emplearán dos de las técnicas de evaluación del EPA "in vitro" e "in vivo" (133, 203) más estandarizadas y aceptadas, contribuyendo con su estudio y aplicación a aportar una base más sólida para la comprensión de este efecto.

Los antimicrobianos constituyen unos compuestos ampliamente utilizados en clínica y los factores que determinan los regímenes de dosificación deben ser analizados con minuciosidad, entre ellos el efecto postantibiótico. Ciertas familias de antimicrobianos, como los aminoglicósidos y quinolonas (183, 203), muestran un EPA más prolongado que otras (43, 90), por lo que el estudio de este fenómeno

puede descubrir datos muy interesantes en la dosificación de estos fármacos, sobre todo en las nuevas y prometedoras moléculas (36, 157, 184).

Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho los objetivos de este trabajo son:

- 1º) Estudiar la actividad "in vitro", CMI, CMB y efecto bactericida, de gentamicina, netilmicina, isepamicina, ciprofloxacino, fleroxacino y lomefloxacino frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923 y Escherichia coli ATCC 25922.*
- 2º) Evaluar el EPA "in vitro" de dichos antimicrobianos y cepas estándar mediante la técnica de eliminación por dilución.*
- 3º) Evaluar el EPA y efecto bactericida "in vivo" de los mismos compuestos y microorganismos mediante el modelo de infección en muslo en ratón neutropénico.*
- 4º) Analizar comparativamente la eficacia de la experimentación animal y los estudios "in vitro" para la evaluación del EPA.*
- 5º) Revisar la influencia del EPA y otros factores en la instauración de los regímenes de dosificación de aminoglicósidos y fluorquinolonas.*

III. INTRODUCCION

El conocimiento, en el sentido más amplio, de la microbiología y la infección, se ha revelado hoy en día como uno de los pilares fundamentales de la medicina moderna con importantes repercusiones sanitarias y sociales.

La aparición de la "era antimicrobiana" y el desarrollo de la quimioterapia a partir de los años 40, permitió un espectacular avance en la historia de la humanidad en su lucha contra la enfermedad infecciosa, causa hasta entonces de un gran número de muertes humanas.

Aunque el progreso en esta materia ha sido espectacular (por ejemplo la erradicación de la viruela), queda mucho camino por recorrer, y surgen nuevas enfermedades (como el SIDA y las producidas por microorganismos poco habituales) y nuevos antimicrobianos (por ejemplo las modernas quinolonas), sobre los que hay que seguir estudiando e investigando.

En la relación huésped-microorganismo-antimicrobiano (fig. 1)



Fig. 1- Triángulo de Davis.

intervienen factores que se interrelacionan y que es importante no olvidar a la hora de encontrar el antimicrobiano ideal, es decir, aquél que sea específico del microorganismo e inocuo para el hombre.

Aunque algunos puntos de este triángulo se conocen mejor (infección) que otros (inmunidad), es quizás la relación más estudiada, la antimicrobiano-microorganismo (60, 97, 104) y, respecto a ella, aún se siguen encontrando aspectos nuevos, sobre todo con quimioterápicos modernos (93, 115, 119, 175), que influirán en su aplicación práctica (110, 142, 146, 152, 189).

Así, la evaluación de un antimicrobiano por su sensibilidad frente a los microorganismos, tanto "in vitro" como "in vivo", constituye un primer paso esencial para lograr el objetivo principal de la microbiología médica, esto es, poner fin a las enfermedades infecciosas en el hombre.

1. ANTIMICROBIANOS

Durante muchas décadas el principal control de las enfermedades bacterianas se basó casi exclusivamente en su prevención. La idea de una acción directa sobre el parásito la sugirió Paul Ehrlich a principios de siglo, y con él empezó lo que se conoce como "quimioterapia", no obstante, sus éxitos fueron muy limitados.

El desarrollo de la industria antimicrobiana se inició en 1935 con la aparición de las sulfamidas, aunque el gran avance lo supuso el descubrimiento del primer antibiótico (agentes antimicrobianos de origen microbiano), la penicilina, por Alexander Fleming en 1929. Esta se purificó y comercializó con gran éxito diez años después y este hecho se tradujo en la búsqueda de nuevos antibióticos, hasta que en 1944 Waksman y cols. descubrieron la estreptomicina.

A partir de los años 40, han sido aislados y caracterizados miles de fármacos y antibióticos (en general llamados "antimicrobianos"), ya sean de origen natural, mejorados por transformación química o sintetizados químicamente, aunque sólo una pequeña parte de éstos tiene valor terapéutico.

La clasificación de los antimicrobianos se realiza teniendo en cuenta principalmente criterios de acción antimicrobiana y de estructura química (7):

1. Inhibidores de la síntesis de la pared celular

(beta-lactámicos, glicopéptidos, bacitracina, lipopéptidos, glicolipopéptidos, fosfomicinas)

2. Inhibidores de ácidos micólicos

3. Activos sobre membrana citoplásmica bacteriana

(péptidos cíclicos, polimixinas)

4. Quelantes de iones metálicos

(8-hidroxi-quinoleínas)

5. Inhibidores de la síntesis de proteínas

(aminoglicósidos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicoles, ácido fusídico, estreptograminas)

6. Inhibidores de ácidos nucleicos

(quinolonas, novobiocinas, rifamicinas, 5-nitro-imidazoles, 5-nitro-furanos, antifólicos)

Paralelamente al uso masivo de los antimicrobianos, el microorganismo creó sus propios mecanismos de resistencia frente a dichos fármacos. Este tema es de gran interés y actualidad (87, 179, 185), al no existir en la actualidad antibióticos de uso clínico que no hayan inducido resistencias en las bacterias (7).

La resistencia bacteriana viene determinada por las características genéticas de una especie o por material genético adquirido en procesos de transformación, conjugación o transducción. Los mecanismos son variados y encontramos inactivaciones por enzimas, impermeabilidad al paso del antimicrobiano, alteración del objetivo del antimicrobiano, etc...

Los antimicrobianos se encuentran con otro tipo de resistencia, la ambiental, debida a factores físicos (temperatura, luz) o químicos (pH, iones, presencia de oxígeno) donde crece la bacteria (40, 93, 185). En este punto, conociendo los aspectos que afectan a la actividad bactericida de un antibiótico, se puede decidir dónde y cuando éste debe ser aplicado.

El estudio del antimicrobiano y todo lo que pueda influir sobre su actividad, sobre todo en el caso de prometedoras moléculas nuevas, permitiría el planteamiento de una terapia más racional y una política de antibióticos más controlable, lo cual supondría siempre un mayor beneficio para el paciente.

1.1. AMINOGLICOSIDOS

Desde que se descubrió la primera sustancia antibiótica de este familia, la estreptomicina, esta grupo de antimicrobianos ha sido y continúa siendo uno de los más utilizadas en la terapéutica clínica habitual.

El descubrimiento de nuevos compuestos semisintéticos, derivados de los antiguos, y la controversia sobre las pautas de administración, hacen de esta familia de antimicrobianos, una de las más actuales e interesantes para su estudio.

Su origen es natural o semisintético y, su estructura química consiste en

aminoazúcares unidos por puentes glicosídicos a aminociclitoles, denominándose correctamente "aminoglicósidos aminociclitoles", aunque habitualmente sólo se utiliza para designarlos el término "aminoglicósidos".

Clasificación de los aminoglicósidos según su estructura química (7)

1. de ciclo estreptamina

estreptomina

2. de ciclo deoxiestreptamina

**** 4,5 sustituidos***

neomicina, paramomicina/aminosidina, ribostamicina

**** 4,6 sustituidos***

kanamicina, dibekacina, tobramicina, amikacina

**** grupo gentamicina***

gentamicina, netilmicina, isepamicina, sisomicina

**** espectinomicinas***

espectinomicina, trospectomicina

El mecanismo de acción de los aminoglicósidos sería doble (7, 47, 48, 86, 98, 155, 168):

- 1.- Inhibición de la síntesis de proteínas por su unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, provocando fallos de lectura del RNA-m, con fabricación de complejos aberrantes en la iniciación de la síntesis, y aparición de proteínas anómalas (efecto primariamente bacteriostático).*
- 2.- Alteraciones en la membrana debidas a la inserción de proteínas las cuales producen canales anormales, con pérdida de moléculas*

esenciales y entrada masiva de aminoglicósido (efecto de carácter bactericida).

La penetración "primaria" de los aminoglicósidos (48, 185) a través de la membrana citoplásmica (probablemente por difusión pasiva) es muy pequeña, y sólo algunas moléculas llegan a los ribosomas. Sin embargo estas moléculas que logran pasar inducen la síntesis de proteínas anómalas y éstas forman canales anormales en la membrana que conducen a un estado de "excitación membranaria" con aumento del transporte activo de antibiótico. Se produce, entonces, un fomento rápido y autocatalítico de la entrada de aminoglicósido, cuya unión al ribosoma es irreversible, hasta límites incompatibles con la supervivencia celular.

Su espectro de acción es muy amplio (27, 185), comprendiendo la práctica totalidad de las enterobacterias y bacilos Gram-negativos no fermentadores, así como los cocos Gram-positivos (excepto estreptococos) y Gram-negativos. No tienen actividad frente a Haemophilus , Bacteroides fragilis y otros anaerobios. Son más eficaces frente a bacterias en crecimiento activo, y los aminoglicósidos más modernos (netilmicina, isepamicina) tienen, en general, mejor actividad que los antiguos (estreptomina, neomicina, kanamicina).

La acción es bactericida puesto que eliminan el 99% de las bacterias sensibles a los 60 minutos de contacto con el antibiótico. La actividad disminuye en condiciones anaerobias y no existe efecto inóculo.

Los mecanismos de resistencia frente a los aminoglicósidos son los siguientes (7, 175):

- resistencia ribosómica: Se produce por una mutación a nivel ribosómico que altera la afinidad del antimicrobiano por él. Es importante en estreptomina.*
- enzimas modificantes: Son las más importantes y abundantes, y la resistencia al aminoglicósido se produce por modificación química del mismo. Están determinadas por plásmidos R transferibles.*

- impermeabilidad: por disminución o bloqueo de los lugares de unión de los cationes divalentes (Ca^{++} y Mg^{++}) y de los aminoglicósidos a la membrana externa por parte de la proteína H_1 . Se produce por mutación.

En cuanto a la **farmacocinética**, no se absorben prácticamente por el tubo gastrointestinal, por lo que se administran vía intramuscular (IM) o intravenosa (IV) (185). Se absorben muy bien por serosas (vía subconjuntival, peritoneal o pleural). Penetran poco en el SNC, ojo, tejido pulmonar y secreciones bronquiales, aunque se distribuyen bien por el organismo. Se eliminan por vía renal, principalmente por filtración glomerular. La vida media de los aminoglicósidos oscila entre 1.5 y 4 horas. La **dosis diaria** oscila entre 3-15 mg/kg repartidos en dos o tres dosis.

La **toxicidad** es variable e importante entre los distintos compuestos, y son el factor principal limitante del uso de los aminoglicósidos (85, 123, 185). La más importante es la toxicidad auditiva y vestibular y la nefrotoxicidad. También pueden producir bloqueo neuromuscular y reacciones de hipersensibilidad. Las diferencias cuantitativas de toxicidad entre los distintos aminoglicósidos dependen del tiempo de tratamiento, niveles séricos, y otros factores de riesgo, como la insuficiencia renal.

Sus **indicaciones** son en procesos sépticos graves de posible etiología aerobia.

Respecto a las **interacciones** se utilizan en combinación con los beta-lactámicos, aunque hay riesgo de una posible inactivación con las penicilinas (177).

A continuación se señalan algunos aspectos de interés particular para gentamicina, netilmicina e isepamicina, los tres aminoglicósidos estudiados en este trabajo.

1.1.1. Gentamicina

Es una sustancia alcalina, muy estable e hidrosoluble, de la cual existen tres variedades, gentamicina C_1 , C_{1a} , y C_2 , (las principales son C_1 y C_2).

Estructura química: La gentamicina es un compuesto formado por un anillo de desoxiestreptamina unido por los carbonos 4 y 6 a dos aminoazúcares, dejando un grupo OH libre en posición 5. Los distintos radicales que puede poseer dan los diferentes compuestos mayoritarios que forman la gentamicina (C_1 , C_2 y C_{1a}). (Ver figura 2)

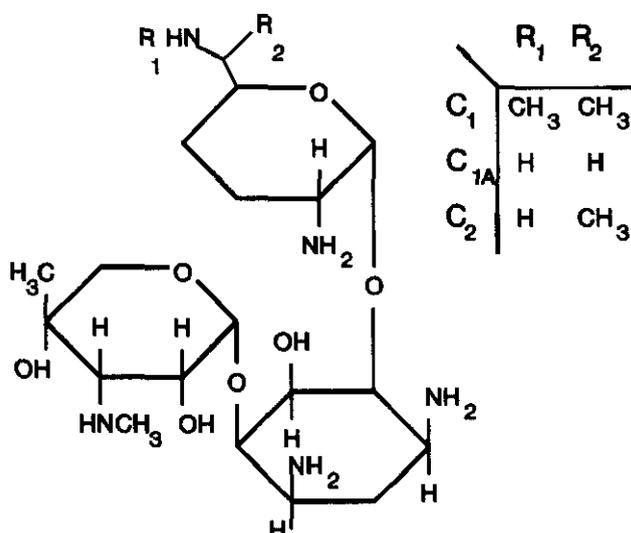


Fig. 2- Estructura química de gentamicina.

Actividad antibacteriana: Tiene buena actividad sobre la mayoría de las enterobacterias y Pseudomonas. También son muy activas frente a Staphylococcus. Muy poca actividad sobre estreptococos, meningococo, gonococo y Listeria. Presenta

sinergismo con ampicilina frente a enterococo y con las cefalosporinas sobre Klebsiella. También se utiliza el sinergismo con los β -lactámicos frente a Pseudomonas aeruginosa (104, 185, 190).

***Desarrollo de resistencias:** Es rara la resistencia en enterobacterias y Staphylococcus, aunque actualmente se ha hecho frecuente en cepas de Pseudomonas aeruginosa y Serratia en los hospitales, que además suelen presentar resistencia cruzada con tobramicina y amikacina. El desarrollo de resistencias durante el tratamiento suele ser muy escaso (185).*

***Farmacocinética:** Alcanza los niveles máximos vía IM a los 60 minutos (185). Las concentraciones séricas máximas y mínimas después de una inyección de 80 mg son de 5.1 y 0.6 mg/l (a las 6 horas), respectivamente. Por vía IV, tras la infusión continúa de 6.6 mg/hora, se mantienen concentraciones de 1 mg/l. La vida media es de 1.5 - 2 horas, y prácticamente no se une a proteínas.*

1.1.2. Netilmicina

***Estructura química:** Aminoglicósido semisintético derivado de la sisomicina y de estructura similar al componente C_{1a} del complejo de la gentamicina, del que difiere por tener un radical n-etil. (Ver figura 3)*

***Actividad antibacteriana:** La efectividad frente a las enterobacterias es similar a la gentamicina, pero menos activa con Pseudomonas aeruginosa. Es activa contra meningococo, gonococo y Haemophilus influenza. La mayoría de las cepas de S.aureus y S.epidermidis son sensibles (60, 104, 190).*

***Desarrollo de resistencias:** El principal interés de la netilmicina es su*

actividad frente a un porcentaje de cepas de enterobacterias y de Pseudomonas aeruginosa que han adquirido resistencia a la gentamicina (127). En general, es activa frente a cepas que inactivan a los aminoglicósidos bien mediante fosforilación o adenilación, y posee una actividad variable contra las cepas que se acetilan, dependiendo del tipo de mecanismo.

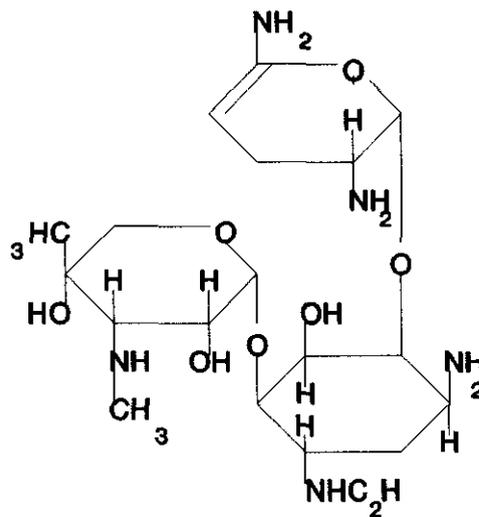


Fig. 3- Estructura química de netilmicina.

Farmacocinética: La dosis diaria es de 4 a 6,5 mg/kg/día administrada en tres dosis vía IM o IV. La unión a proteínas es muy baja, del orden de un 0 a 25% (79, 205). La vida media oscila entre 1,7 y 3,3 horas y la difusión es, en general, similar a la de gentamicina (137). En tejidos (corazón, hígado, músculo y ganglios linfáticos) se alcanzan concentraciones similares a a las séricas (107). La difusión extravascular es más rápida que para gentamicina (165), por lo que el pico es más lento y la desaparición inicial del plasma más rápida.

Toxicidad: Menos tóxica que gentamicina, con ototoxicidad baja y

nefrotoxicidad poco importante, moderada y reversible (85, 123, 127).

1.1.2. Isepamicina

La isepamicina es un antimicrobiano en investigación que aún no ha sido comercializado en España.

Estructura química: La isepamicina es un derivado semisintético 1-N-s- α -hidroxi- β -aminopropionil de la gentamicina B, cuya estructura se puede observar en el apartado anterior (figura 4).

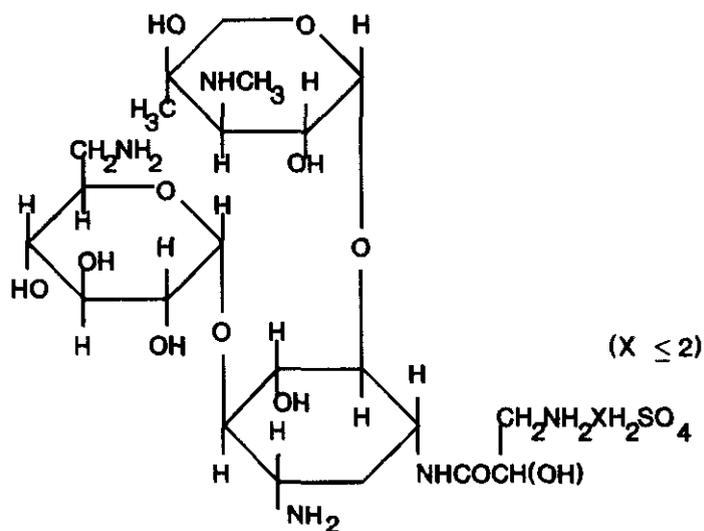


Fig. 4- Estructura química de isepamicina.

Actividad antibacteriana: Su poder bactericida parece más elevado que muchos de los actuales compuestos de esta familia (8, 103, 138, 160, 174, 177,

190). Al igual que gentamicina es activa frente a casi todas las bacterias gram-negativas no fermentadoras. Frente a Pseudomonas es igual de efectiva que amikacina. Es activa frente a Staphylococcus coagulasa-positivo y negativo. No presenta actividad frente al gonococo, estreptococos del grupo D ni anaerobios, aunque Haemophilus si tiene cierta sensibilidad.

Desarrollo de resistencias: En general presenta una menor sensibilidad ante las enzimas inactivantes de los aminoglicósidos (87, 138, 174), excepto algunas cepas de Gram-negativos y Pseudomonas, y ciertos Staphylococcus. El mayor número de resistencias se deben a mecanismos de impermeabilidad en Pseudomonas.

Farmacocinética: La vida media es de 1.8 horas. Para dosis entre 2 y 16 mg/kg se alcanza el pico de concentración máxima entre 0.5 y 2 horas. La eliminación se produjo en un 90% por vía urinaria, con una pequeña fracción por vía biliar, al igual que gentamicina (138). El porcentaje de unión a proteínas es muy bajo, del orden de un 3 a 8% en ratas, perros y hombre.

Toxicidad: Aunque aún no se ha observado en humanos estudios preliminares afirman que isepamicina es menos nefrotóxica en ratas que amikacina o gentamicina, aunque amikacina fue menos ototóxica que isepamicina en un estudio realizado en cobayas.

1.2. QUINOLONAS

El desarrollo de las quinolonas tuvo un progreso lento y tuvieron que pasar más de quince años desde el descubrimiento del ácido nalidíxico (padre de las 4-

quinolonas), hasta la aparición de las quinolonas fluoradas a finales de los años setenta. Desde entonces, han surgido nuevas fluorquinolonas que han revolucionado la terapia antiinfecciosa por sus grandes ventajas antibacterianas, farmacocinéticas y de inocuidad en el hombre.

Las quinolonas no tienen una estructura química básica idéntica, pero sí comparten un esqueleto base que es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, abreviadamente 4-quinolona. Derivan de cuatro grupos o subfamilias en las que se introduce una serie de modificaciones que comportan las diferencias entre unas quinolonas y otras. Una característica de los nuevos agentes es la fluoración de la estructura básica llamándose fluorquinolonas, lo que les confiere mejor actividad bactericida y menor susceptibilidad a las resistencias. Todas ellas son ácidos orgánicos, y por tanto, intensamente lipófilos y con un alto pK.

Clasificación de las 4-quinolonas según su estructura química.

Subfamilias:

1. Naftiridina

ácido nalidíxico, enoxacina

2. Cinolina

cinoxacina

3. Piridopirimidina

ác.piromídico, ác.pipemídico

4. Quinolona : fluorquinolonas (excepto ác.oxolínico)

ác.oxolínico, acrosoxacina, amifloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina, flumequina, fleroxacina, lomefloxacina, R-835, S-25932

El mecanismo de acción es complejo y no está aclarado totalmente. Se

podría decir que existen dos mecanismos principales que al actuar conjuntamente producen la acción bactericida (64, 78, 96, 186):

- 1.- Inhibición de la ADN-girasa bacteriana (ADN topoisomerasa II, inductora del superenrollamiento del ADN bacteriano), evitando la reparación de las roturas resultantes de la acción de las subunidades alfa de la ADN-girasa. Esto explicaría la elongación anormal observada en la bacteria, ya que el ADN carece de superenrollamiento y se encuentra demasiado expandido.
- 2.- Producción de exonucleasas, y consecuentemente lisis celular, probablemente por una unión directa sobre el ADN bacteriano, (genes SOS ?) manteniendo las interrupciones monocatenarias realizadas por la subunidad alfa de la ADN-girasa (10). (Esto requeriría síntesis de ARN y de proteínas antes de apreciarse la actividad de la quinolona).

Este parece ser el **mecanismo A** de acción de todas las quinolonas, sin embargo, se ha propuesto un segundo **mecanismo B** adicional que no requeriría síntesis de ARN y que actúa sobre bacterias que no se dividen, por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina, fleroxacina y lomefloxacina, que poseerían los dos mecanismos A y B. Se especula sobre la aparición de un **mecanismo nuevo bactericida** presente en algunas modernas fluorquinolonas (117) que son activas frente a bacterias anaerobias, ya que el oxígeno se muestra esencial para el resto de las 4-quinolonas (96, 182, 186). Recientemente ha habido alguna discrepancia sobre este punto al observar algunos investigadores que la presencia o ausencia de oxígeno no influía en la CMI de ciprofloxacina (40).

La fijación celular es rápida (52, 157, 158), cuestión de minutos para enterobacterias y S.aureus, y disminuye con la presencia de iones magnesio o calcio, baja temperatura y pH ácido. Se ha propuesto el siguiente modelo de

penetración de quinolonas para las bacterias Gram-negativas. (No hay suficiente información para extraer conclusiones en las bacterias Gram-positivas):

- 1) El paso de la membrana externa sería por difusión pasiva a través de poros OmpF o bien vía fosfolípidos.*
- 2) El transporte en la membrana citoplásmica es un proceso de difusión, aunque hay alguna evidencia de que esté acoplado a una fuerza protón-motriz.*
- 3) Existe un transporte activo en la membrana citoplásmica que extrae la quinolona de la bacteria hacia el periplasma*
- 4) El transporte hacia el exterior posiblemente ocurre a través de poros tipo OmpF, implicando o no a los fosfolípidos.*

Como consecuencia de este transporte la quinolona se acumula en la bacteria hasta cuatro veces más que la concentración externa.

Su espectro de acción es amplio y varía desde algunas especies de bacterias Gram-negativas de las primeras quinolonas, hasta el aumento gradual a otras bacterias en las nuevas quinolonas; primero contra enterobacterias y otros aerobios Gram-negativos, más tarde frente a ciertos aerobios Gram-positivos y bacterias intracelulares, y más recientemente contra los anaerobios y ciertos protozoos (10, 66, 105). El efecto es bactericida y, en general, hay una buena correlación entre CMI e inhibición de la ADN-girasa (28, 157).

La ciprofloxacina es la más activa de las disponibles para uso clínico, aunque no deben olvidarse otras propiedades igualmente importantes en la evaluación de un antibiótico. En general no existe efecto inóculo, pero a la CMI sólo se inhibe el crecimiento celular, así que este parámetro no daría una indicación real de la actividad bactericida (117, 186).

Una característica que tienen las quinolonas es que al ser examinadas en una cierta gama de concentraciones usando un intervalo de tiempo único, la

proporción de bacterias que sobreviven el tratamiento siempre sigue una *respuesta bifásica*, ya que estos antimicrobianos muestran una única concentración bactericida óptima (CBO) tal, que cualquier concentración más alta o más baja que ésta causará un menor número de muertes entre las bacterias.

La hipótesis que explica este fenómeno según diversos autores (117, 186) es que, a altas concentraciones de quinolona se inhibe totalmente la ADN-girasa, consecuentemente se altera el ADN y no puede transcribirse a ARN; cómo la síntesis de ARN es un requisito de actuación de las 4-quinolonas, éstas ya no podrían hacerlo.

Las resistencias de importancia clínica que se han encontrado son fundamentalmente cromosómicas, por modificación enzimática de la subunidad alfa de la ADN-girasa (72, 176), o por modificación de la permeabilidad de los poros (84), probablemente por alteración de los lipopolisacáridos de la pared, impidiendo la entrada de estos compuestos dentro de la bacteria y dificultando la salida de otras sustancias. Este último tipo de resistencia es más frecuente en Klebsiella, Enterobacter, Serratia y Pseudomonas (78).

Las características farmacocinéticas son muy similares entre las quinolonas, exceptuando las llamadas de primera generación (ác.nalidíxico, ác.oxolínico, ác.pipemídico, ác.piomídico y fluomequina, entre otros). Destaca sobre todo la buena absorción que presentan por vía oral, oscilando el tiempo máximo entre 1 y 3 horas (53, 95). Las constantes de absorción y eliminación son independientes de la dosis administrada por lo que el incremento de la C_{max} y el área bajo la curva es proporcional al incremento de la dosis. La vida media sérica de los nuevos compuestos es elevada, entre 3-4 horas. En general, se unen a proteínas plasmáticas en un bajo porcentaje normalmente inferior al 50%. La difusión hística es amplia (19, 209), alcanzando en general altas concentraciones en los tejidos periféricos y fluidos orgánicos, oscilando su volumen de distribución entre 1 y 3

l/kg. La penetración en macrófagos y polimorfonucleares, es elevada. La eliminación (210) es mayoritariamente renal (tanto por filtración glomerular como por secreción tubular activa), y un menor porcentaje por ruta transintestinal, aunque hay variaciones y cada caso ha de ser estudiado en particular. La dosis diaria oscila entre 200 y 800 mg vía oral (V.O.) y, en general, la cinética de administración V.I. no cambia de manera sustancial (207).

Los efectos secundarios y toxicidad (147) son pocos considerándose a las fluorquinolonas son antibióticos relativamente seguros. Las reacciones adversas más frecuentes afectan al aparato digestivo con náuseas, vómitos y diarreas. Por parte del sistema nervioso central se han descrito insomnios, cefaleas y convulsiones. Se han descrito reacciones de fotosensibilidad. Las fluorquinolonas no deben ser usadas en niños debido a un posible daño en el cartílago.

Las indicaciones más frecuentes de las quinolonas, especialmente las fluoradas, son en infecciones respiratorias, urinarias, intestinales, osteoarticulares, de la piel y tejidos blandos, infecciones de transmisión sexual e infecciones sistémicas graves (95, 144).

En cuanto a las interacciones pueden disminuir el aclaramiento plasmático de teofilina, incrementar la vida media de la cafeína, y no deben administrarse junto con alimentos ni antiácidos con aluminio y magnesio (95, 147).

Se señalarán algunos aspectos de interés particular para ciprofloxacina, fleroxacina y lomefloxacina.

1.2.1. Ciprofloxacina

Estructura química: Ciprofloxacina (ácido-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-7 [1-piperazinil] 3-quinolein carboxílico) es una fluorquinolona con estructura de 4-quinolona de origen sintético (figura 5). La fluoración en posición 6 y el anillo piperazínico en posición 7 han mejorado la actividad de este compuesto, por ejemplo el radical 1-piperacínico en posición 7 potencia notablemente su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* (31, 69).

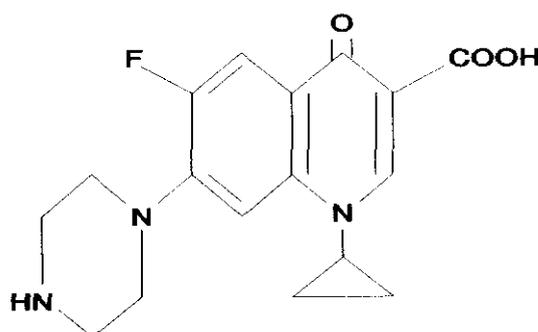


Fig. 5- Estructura química de ciprofloxacina.

Actividad antibacteriana: Su acción es predominantemente bactericida (9, 31, 58, 69) y posee un amplio espectro que abarca cocos y bacilos Gram-positivos y Gram-negativos, aerobios, facultativos y anaerobios, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Micobacterium*. La actividad es particularmente alta sobre enterobacterias y pseudomonas. Actúa tanto en fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria, su potencia bactericida aumenta a pH alcalino y no influyen

las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (40, 186).

Desarrollo de resistencias: Aunque no es muy frecuente, se han desarrollado resistencias por mutaciones en la ADN-girasa en varias especies entre las que se incluyen S.marcescens, K.pneumoniae y más frecuentemente P.aeruginosa (31). También se han observado resistencias cruzadas con las ureidopenicilinas, las cefalosporinas y los aminoglicósidos, probablemente por una mutación cromosómica que implica cambios en los poros de la membrana celular, inhibiéndose así la penetración del antimicrobiano (7).

Farmacocinética: La absorción de ciprofloxacina tras su administración por v.o. es buena (75-80%) y se produce con rapidez alcanzando la C_{max} entre 1 y 1,30 horas después de su administración (20, 50, 94). Por v.i. la concentración sérica disminuye rápidamente, aproximadamente a la cuarta parte de la dosis, en los primeros 30 minutos (31). Su distribución tisular es muy amplia (44), la penetración intracelular es buena y el volumen de distribución en estado estacionario oscila entre 2 y 3 l/kg, por tanto, las concentraciones en los diferentes tejidos orgánicos son elevadas. La unión a proteínas es baja, 20-28%. La vida media de eliminación se sitúa entre 3 y 5 horas (210). Como consecuencia de la eliminación preferentemente renal, la ciprofloxacina alcanza en orina concentraciones muy elevadas.

1.2.2. fleroxacina

Estructura química: Fleroxacina, cuyo nombre químico es 6,8-difluoro-1-[2-fluoroetil]-1,4-dihidro-7[4-metil-1-piperazinil]-4-oxo-3-quinoleín carboxílico es una nueva quinolona fluorada de origen sintético (figura 6).

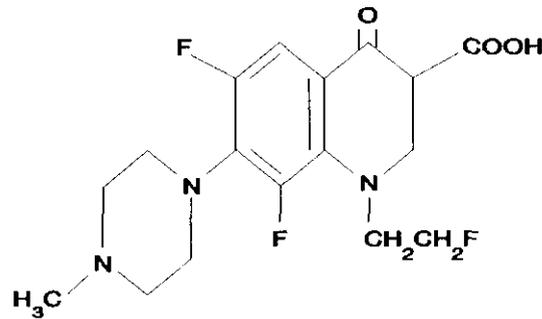


Fig. 6- Estructura química de fleroxacina.

Actividad antibacteriana: Posee una gran actividad frente a enterobacterias, Neisseria spp. y Haemophilus influenzae y buena actividad también contra estafilococos, Pseudomonas aeruginosa y Branhamella catarrhalis; en estos casos la actividad es comparable a la de norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, enoxacin y NY-198, pero es algo menor que ciprofloxacina (36, 71, 92, 125).

Se ha de tener precaución con inóculos altos de S.aureus y otros estafilococos al determinar la actividad de fleroxacin "in vitro" puesto que las bacterias no viables expuestas a fleroxacin pueden filamentarse; asimismo hay que tener en cuenta que la actividad de dicho antibiótico disminuye a pH 5 (93).

Desarrollo de resistencias: Fleroxacin es activa frente a ciertas cepas de P.aeruginosa gentamicin-resistente, S.aureus meticilín-resistente y enterobacterias resistentes al ác.nalidíxico; no obstante, en estas últimas se ha observado una tendencia a disminuir la susceptibilidad, posiblemente por una gran similitud en los

mecanismos de permeabilidad de la membrana externa (71, 92, 93).

Farmacocinética: Después de administrar una dosis de 400 mg v.o. en humanos (88, 152, 210), la C_{max} y la vida media de eliminación fueron muy altas (más que para ciprofloxacina y lomefloxacina), aproximadamente 11 horas y 5 $\mu\text{g/ml}$, con una AUC también muy elevada; esto podría explicar las altas concentraciones alcanzadas en suero y tejidos (92, 143, 204). Además, fleroxacina posee una rápida penetración en fluidos biológicos, suero y células (110) así como en abscesos (211).

1.2.3. Lomefloxacina

Estructura química: Lomefloxacina es una nueva quinolona difluorada, con un radical 3-metil piperacina (figura 7).

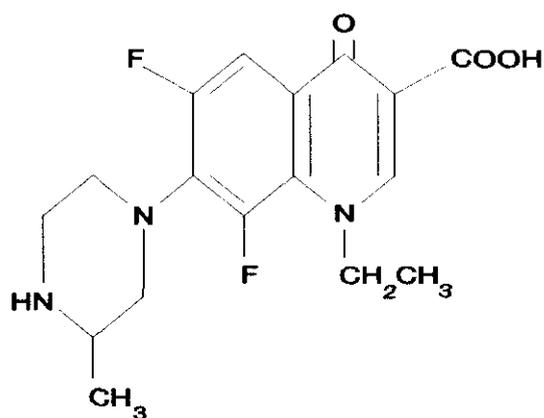


Fig. 7- Estructura química de lomefloxacina.

Actividad antibacteriana: La actividad es similar a la de norfloxacin y enoxacin frente a bacterias Gram-negativas, incluyendo cepas multirresistentes y Pseudomonas spp., aunque para Gram-positivas es algo menor, especialmente contra Streptococcus faecalis (32, 102, 116, 208). Lomefloxacin tiene un efecto bactericida rápido (con concentraciones cercanas a la CMI) sobre células en fase logarítmica, pero no posee actividad con bacterias en fase estacionaria, observándose un rápido recrecimiento (35, 157). Pierde actividad con luz brillante o solar (116) y con pH ácido; la temperatura le afecta mínimamente.

Desarrollo de resistencias: Recientemente, en experimentos "in vitro" con cepas de aislados clínicos, se han encontrado mutantes resistentes con mayor frecuencia (35, 169) que en estudios anteriores (102), a partir de subcultivos previamente expuestos a bajas concentraciones de lomefloxacin. También se han seleccionado mutantes de S.aureus y P.aeruginosa, probablemente debido a una mutación puntual cromosómica a nivel del gen *gry-A* (175), cuando se administraba el antibiótico una vez al día, aunque no para E.coli (169).

Farmacocinética: Posee buena absorción oral y una vida media de eliminación en suero prolongada, de 7-8 horas en voluntarios humanos, que permite mantener concentraciones en suero y en orina por encima de la CMI de la mayoría de las bacterias aproximadamente 12 horas (142, 187, 210).

2. EFECTO POSTANTIBIOTICO

La supresión del crecimiento bacteriano que persiste después de una exposición corta del microorganismo al antimicrobiano se había detectado ya desde la llegada de la "era antimicrobiana".

Bigger (23) en 1944 observa este efecto en Staphylococcus y Streptococcus previamente expuestos a penicilina G, y pocos años después Parker y cols. (154) lo comprobaron con el mismo antibiótico y Staphylococcus. Eagle y cols. (55, 56, 57) fueron capaces de demostrarlo con penicilina y otros cocos Gram-positivos tanto "in vitro" como "in vivo".

Sin embargo, la importancia de este fenómeno empieza considerarse en los años 70, cuando se encuentra en varios nuevos antimicrobianos y también en bacterias Gram-negativas (26, 132, 133, 206). Se define el término de "efecto postantibiótico" (EPA), encontrándose su mayor aplicación clínica en la posibilidad de espaciar los regímenes de dosificación de un antimicrobiano sin perder eficacia, y se estandarizan las técnicas para valorarlo.

En este sentido se puede decir que el estudio del EPA es relativamente moderno y aunque los avances han sido grandes (7, 16, 29, 43, 82, 126, 200), todavía hay lagunas en la comprensión de este efecto y en la correcta estandarización de sus técnicas (sobre todo "in vivo") para lograr su aplicación y aceptación en la práctica de la terapia antimicrobiana.

2.1. DEFINICION DEL EPA

El efecto postantibiótico se define como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano (133).

Esta definición llama la atención sobre el hecho de que el EPA es debido a una acción previa del antimicrobiano y no a concentraciones subinhibitorias de éste.

2.2. MECANISMO DEL EPA

El mecanismo por el que los antimicrobianos inducen EPA en los microorganismos es en parte desconocido, ya que las diferencias en la duración de este efecto en las distintas combinaciones antimicrobiano-microorganismo, sugieren que deben existir varios mecanismos implicados. La explicación más probable es que el EPA es debido a los daños no letales producidos por los antimicrobianos y/o a la persistente unión de éstos en determinados lugares bacterianos, lo que se traduce en un retraso en el crecimiento normal de la bacteria.

Los antimicrobianos que actúan a nivel del ribosoma, ARN o ADN (por ejemplo, aminoglicósidos, quinolonas y macrólidos), inhiben la síntesis de proteínas. Así, el EPA podría significar un período de resíntesis de estas proteínas necesarias para el metabolismo o el crecimiento bacteriano y si la unión del antimicrobiano es irreversible la actividad persiste aunque éste haya sido retirado (43, 201).

En el caso de los betalactámicos estos antimicrobianos se unen específicamente a proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), enzimas implicadas en la síntesis de peptidoglicano, produciéndose como consecuencia la detención del crecimiento bacteriano. Una posible explicación es que el EPA es el tiempo requerido por la célula para sintetizar de nuevo estas proteínas (201).

Respecto a otras familias de antimicrobianos el EPA no ha sido estudiado o su mecanismo no se conoce muy bien.

Las diferencias observadas en los EPA para las distintas combinaciones de microorganismo-antimicrobiano, se deberían posiblemente a otros muchos factores (ver apartado siguiente) además del propio mecanismo de acción del antibiótico: diferente afinidad del antibiótico por su diana, distinta capacidad de penetración a

través de la membrana en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, empleo de diferentes técnicas en la evaluación del EPA, utilización de distintas cepas bacterianas, etc.

2.2.1. factores que afectan al EPA

A continuación se enumeran algunos factores que pueden influir en la duración del efecto postantibiótico, ya sea en el laboratorio o en la práctica clínica.

- Tipo de antimicrobiano y microorganismo: Es el factor que más influye en la duración del EPA tanto "in vitro" como "in vivo". En general se puede decir que influye si la bacteria es Gram-positiva o Gram-negativa, la especie microbiana, si es anaerobia o no, su resistencia, etc. El antimicrobiano es importante puesto que cada uno posee diferente grado de acción sobre las distintas bacterias y por tanto diferente capacidad de "daño" celular (43, 57, 201, 203).

- Concentración de antimicrobiano: Para que se produzca EPA es necesario una concentración adecuada del antimicrobiano. En muchos antibióticos el EPA parece ser proporcional a la concentración (aminoglicósidos, quinolonas) aunque hay otros parámetros que también influyen (nivel máximo en suero, dosis total, etc...) (37, 46, 202, 203). En el caso de los betalactámicos, los datos obtenidos parecen indicar que sólo se produce un apreciable EPA cuando las concentraciones ensayadas son de 8-32 veces la CMI, sobre todo con gram-negativos (56).

- Duración de la exposición: El tiempo en que los niveles de antimicrobiano permanecen por encima de la CMI aumenta, en general, la

duración del EPA. Se debe tener precaución en no provocar una excesiva muerte bacteriana ya que esto nos dificultaría la detección del crecimiento. Este factor está ligado, en algunos casos, a la concentración del antimicrobiano y otros parámetros que expresan "in vivo" la farmacocinética de un antibiótico, como el área bajo la curva (ABC o AUC), nivel máximo de concentración, etc. (78).

- Efecto del tamaño del inóculo: Se ha observado en algunos antimicrobianos que a altas concentraciones de ciertas bacterias el EPA no se produce o disminuye bastante (56, 89, 164).

- Fase de crecimiento del microorganismo: Normalmente se utilizan en todas las técnicas bacterias en fase logarítmica de crecimiento, pero hay antimicrobianos que actúan también sobre microorganismos en fase estacionaria (74, 186). Este puede ser un factor importante, sobre todo "in vivo" y con antibióticos de vida media larga.

- Agitación: Aunque la mayoría de los autores no especifican si utilizan o no agitación mecánica, no parece haber diferencias entre unos y otros respecto a este punto en la determinación del EPA "in vitro" (206). Hay algún caso en el que se han encontrado diferencias por ejemplo con ampicilina frente a E. coli, donde la agitación disminuyó el EPA de 1.4 a 0.6 horas (113).

- Tipo de medio y pH: en algún estudio se han comprobado diferencias por la utilización de suero, tipo de agar o caldo (29). El pH afecta quizá de una manera más decisiva que el tipo de medio, por ejemplo a nivel de la ionización de determinadas familias de antimicrobianos, como los aminoglicósidos y fluorquinolonas, repercutiendo en la capacidad de

atravesar la membrana bacteriana y disminuyendo su actividad bactericida (37, 93, 186).

2.3. DETERMINACION DEL EPA IN VITRO

Se han utilizado una gran variedad de técnicas para el cálculo del EPA "in vitro" y casi todas ellas implican la cuantificación del crecimiento bacteriano (excepto una que utiliza criterios morfológicos y que se comentará más adelante) tras la eliminación del antimicrobiano.

2.3.1. Eliminación del antimicrobiano

Principalmente existen dos tipos de técnicas, una de eliminación rápida, y otra, más complicada, que simula una cinética "in vivo" de primer orden en la reducción de las concentraciones de antimicrobiano.

A. Eliminación rápida

- Lavado del antimicrobiano: se realiza mediante una o dos centrifugaciones de los caldos de cultivo a unas 1200 x g durante unos 5-10 minutos, eliminando luego el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en medio fresco (29, 132, 133). La mayor desventaja de este método es que las bacterias pueden mostrar un retraso en el crecimiento (154) debido a efectos mecánicos de la centrifugación, menor acceso a los nutrientes, etc...

- Inactivación del antimicrobiano: es un método simple y rápido, pero

tiene el inconveniente de que es casi exclusivo de los β -lactámicos (23, 56, 57, 130), ya que no se disponen de enzimas comercializadas que inactiven otros antimicrobianos o si existen, como en aminoglicósidos (74), el proceso es complicado.

- Dilución del cultivo: se puede aplicar a cualquier antimicrobiano y es fácil de realizar. Consiste en añadir un pequeño volumen del cultivo con los microorganismos y el antimicrobiano en medio libre de fármaco (29). La cantidad a añadir depende de la concentración de antimicrobiano, utilizándose una dilución 1:1000 si es mayor que la CMI. El inóculo inicial, debe tener al menos 10^5 - 10^6 UFC/ml para que pueda cuantificarse su crecimiento después de la dilución.

- Exposición de microorganismos en un filtro o membrana: Consiste en la exposición de los microorganismos colocados sobre un filtro o membrana a un antimicrobiano que difunde de la superficie de una placa de agar (201). El lavado se produce por repetidas transferencias a placas de agar sin antimicrobiano. La ventaja es que los microorganismos sufren menos daño al no haber tantos efectos mecánicos (cambios osmóticos, etc.), pero tiene el inconveniente de ser más incómodo y trabajoso que los métodos anteriores.

B. Modelos farmacocinéticos

Se han desarrollado modelos "in vitro" que simulan las concentraciones fisiológicas del antimicrobiano, aunque poseen el problema de separar el EPA de los efectos de las concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano.

- Modelos de dilución: Consiste básicamente en realizar continuas diluciones de un frasco de cultivo con antibiótico, añadiendo un volumen de medio fresco igual al extraído (77). El mayor problema es que se diluyen los microorganismos junto con el antibiótico.

- Modelos de diálisis: Se establece una diálisis entre un sistema cerrado que contiene el microorganismo y que está separado de otro, que contiene medio fresco, por una membrana semipermeable (24, 25, 191, 218). El antimicrobiano puede añadirse a un sistema u otro, según el modelo de absorción IV o IM. La ventaja sobre el método anterior es que no se diluyen los microorganismos.

2.3.2. Cuantificación del crecimiento bacteriano

La mayoría de estos métodos utilizan el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en placas de agar (tanto en los modelos de EPA "in vitro" como en los "in vivo"), como la técnica más segura para medir la cinética de crecimiento bacteriano.

Otros autores han utilizado métodos espectrofotométricos (6, 17, 164) que aunque son más rápidos y cómodos tienen el inconveniente de cuantificar turbidez y no microorganismos viables. También se ha utilizado el contenido en ATP intracelular como una medida del crecimiento bacteriano (100, 130), pero este método puede subestimar el EPA, ya que las bacterias muertas intactas todavía contienen ATP intracelular detectable.

2.3.3. Cuantificación del EPA "in vitro"

A. El EPA evaluado según el crecimiento microbiano

En un principio se estimó el período de EPA como un período estacionario de crecimiento que se traducía en un intervalo llano de la curva frente al tiempo (56, 57, 154), pero con frecuencia lo que se observa es un incremento gradual de las bacterias viables hasta que se alcanza el crecimiento normal.

A.1.- En un intento de estandarizar un método para poder comparar resultados entre varias metodologías, se desarrolló la siguiente fórmula (29, 133):

$$EPA = T - C$$

donde T representa el tiempo necesario para que los microorganismos expuestos al antimicrobiano incrementen en 1 Log₁₀ su concentración en el momento de la eliminación del antibiótico, mientras que C es el tiempo requerido por los microorganismos control para incrementar su concentración en 1 Log₁₀ a partir del mismo tiempo.

La razón de utilizar 1 Log₁₀ se debe a que en la mayoría de los microorganismos, éste es el momento en el que se recobra el crecimiento normal (133).

A.2.- Recientemente se ha realizado una cuantificación del EPA basada en el tiempo medio de recuperación (135, 136). Dicho factor se determinaría a partir del área sobre la curva de crecimiento de una

población bacteriana después de la exposición a un antimicrobiano. Este método es posiblemente el más correcto, puesto que tiene en cuenta la recuperación del cultivo en su conjunto a lo largo de la fase de EPA y no un punto determinado a partir del cual se evaluaría el efecto postantibiótico.

Las definiciones anteriores de EPA por incremento de 1 log se pueden considerar como un caso especial de este procedimiento, asumiendo que, el ratio de crecimiento del cultivo control es idéntico al del tratado cuando incrementan 1 log después de la eliminación del antimicrobiano.

B. El EPA definido por criterios morfológicos

Muchos agentes antimicrobianos, por ejemplo betalactámicos y fluorquinolonas (121), alteran la morfología bacteriana e inducen filamentación, sobre todo en bacilos Gram-negativos. Los filamentos son células que contienen varios genomas dentro de un citoplasma común (120) y, cuando se determinan cinéticas de crecimiento se asume que una bacteria corresponde con una UFC, cuando en realidad, cada colonia está correspondiendo a un filamento. Este recuento de UFC por filamento puede conducir a una sobreestimación del efecto postantibiótico en ciertos antimicrobianos.

Lorian (122) define el EPA como el período de tiempo que comprende desde el estado de inactivación enzimática del microorganismo a partir de eliminación del antibiótico, hasta el momento en que las enzimas recuperan su funcionalidad. Según este autor la morfología bacteriana refleja las variaciones en la actividad de esas enzimas, y define el EPA morfológico como el tiempo necesario para que una población de filamentos Gram-negativos alcance la proporción de un 10% de filamentos y un 90% de bacilos lo cual indicaría el final del EPA.

2.4. DETERMINACION DEL EPA "IN VIVO"

Muy pocos han sido los estudios que se han centrado en la supresión del crecimiento bacteriano "in vivo" después de que los niveles de antimicrobiano descendieran por debajo de la CMI. En principio el EPA se podría evaluar en cualquier tejido o fluido corporal en el que fuera posible un recuento de UFC y una medición de la concentración de antimicrobiano (59).

2.4.1. Modelos experimentales

Existen dos tipos de modelos animales, los propiamente "in vivo", en los que se desarrolla una infección real, y los "ex-vivo", en los que los microorganismos están localizados en cámaras o hilos de algodón implantados en el animal.

A. Modelos experimentales "in vivo"

- Modelo de infección en muslo de ratones neutropénicos: Este modelo ha sido estandarizado por Craig y cols. (81, 83, 203), aunque ya se había empleado antes con ratones sin inmunodeprimir (57, 166). Se emplean los niveles de antimicrobiano en suero para estimar con relativa precisión los del fluido intersticial en muslo (34, 170, 171, 172); además, para asegurar que posibles niveles residuales del antibiótico tuvieran actividad (203) se reinfecan los ratones tratados, con microorganismos en fase exponencial, viendo que crecen normalmente.

Este modelo tiene muchas ventajas: es relativamente barato, el efecto

del sistema inmune queda anulado, el muslo del ratón puede extraerse fácilmente, cuantificar el número de UFC en el homogenizado de muslo no presenta dificultades, y hay posibilidad de comprobar la posible actividad subinhibitoria del antimicrobiano.

- Modelo de meningitis en conejos: Sande y cols. (173, 188), han utilizado este modelo, que posee las ventajas de que la concentración de antimicrobiano puede hallarse fácilmente en el sitio de infección y que el EPA puede determinarse para cada animal separado. Aunque posteriormente se ha demostrado actividad de los niveles de sub-CMI con penicilina frente a S.pneumoniae, la falta de EPA con penicilina G y neumococo en este modelo es consistente con los datos encontrados en el modelo anterior.

- Modelo de endocarditis en ratas: este modelo ha sido utilizado por Hessen y cols. (89, 90, 91), para producir una endocarditis mediante la introducción de un catéter en la arteria carótida o vena yugular, por el que se inocula 24 horas después el microorganismo. Un día más tarde, se administra el antimicrobiano por vía intramuscular, y posteriormente se determinan el número de UFC y concentración de antimicrobiano en las vegetaciones producidas en las válvulas mediante técnicas estándar (bioensayo, RIA).

En este modelo el EPA de imipenem con o sin gentamicina no ha podido ser demostrado, aunque sí por otras técnicas (6).

La principal desventaja de este modelo es su laboriosidad y que resulta algo caro para hacer los estudios extensivos a otros antimicrobianos.

A. Modelos experimentales "ex-vivo"

- Modelo de cámaras en conejos: Se utilizan unas cámaras de acero

en forma de red (llamadas TCF o Tissue Cage Fluid) y con un buffer, que son implantadas cuatro semanas antes del experimento en la espalda de conejos sanos (148). Los microorganismos son expuestos al antimicrobiano en las cámaras de conejos tratados. Después de la exposición las TFC son extraídas, tratadas con betalactamasas y reimplantadas en conejos sin tratamiento. Cada tiempo de muestra se extrae una parte del líquido de las cámaras y se hallan las UFC y concentraciones del antimicrobiano (70). Penicilina G indujo EPA frente a *S.pyogenes* aunque en el modelo de infección en muslo no se ha encontrado.

- Modelo de hilos de algodón en ratones: Renneberg y Walder (162, 163) han puesto a punto este modelo que junto con el de infección en muslo son probablemente los mejor estandarizados. Se implantan subcutáneamente hilos de algodón empapados de una solución con bacterias en la espalda de ratones normales, administrándose dos horas más tarde el antibiótico V.I. Posee grandes ventajas: extrayendo los hilos puede determinarse la concentración de antibiótico en el sitio de infección, posibilidad de controlar la acción de las concentraciones subinhibitorias por intercambio de dichos hilos con los de ratones sin tratar, y por último que permite trabajar con diferentes bacterias a la vez.

2.4.2. Cuantificación del EPA "in vivo"

El recuento bacteriano se realiza como en "in vitro", por dilución y siembra en placa de agar, en este caso de homogeneizados de los tejidos o fluidos infectados. Posteriormente se realizan curvas de crecimiento en los animales controles y tratados en log UFC/muslo, ml o vegetación, según la técnica, respecto al tiempo (en horas),

y sobre ellas se calcula el EPA. Actualmente existen dos fórmulas para la cuantificación del EPA que difieren ligeramente entre sí:

A) Una desarrollada por Vogelman y cols. (203).

$$EPA = T - C - M$$

donde *M* representa el tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero exceden la CMI, *T* es el tiempo requerido para que el número de UFC en los animales tratados incremente 1 log a partir del tiempo *M*, y *C* es el tiempo para que el número de UFC en los animales control incremente 1 log a partir del momento en que se administra el antimicrobiano.

B) Y otra empleada por Renneberg y Walder (163).

$$EPA = T - C$$

donde *T* es el tiempo requerido para que el número de UFC en los animales tratados incremente 1 log a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano descienden de la CMI (factor *M* en la fórmula de Vogelman), y *C* es el tiempo requerido para que el número de UFC en animales control incremente 1 log a partir del momento en que se administra el antibiótico.

Es probable que en la primera fórmula se produzca una subestimación del efecto postantibiótico ya que el tiempo *M* es considerado dos veces de modo distinto para animales control y tratados y el sustraendo siempre es mayor que en la segunda ecuación.

2.5. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL EPA

2.5.1. Aplicación clínica

La aplicación más importante del EPA está en los protocolos de dosificación de los antimicrobianos. Así, determinadas combinaciones de microorganismo-antimicrobiano que induzcan un EPA prolongado podrán administrarse de forma intermitente sin miedo a perder eficacia (62, 146, 194, 195, 197). Las ventajas de este tipo de dosificación se traducirían en una dosificación más cómoda, reducción de los riesgos de toxicidad para el paciente y disminución de los costes sanitarios (material desechable, personal especializado para pinchar, etc) (49, 144, 194). Otros antimicrobianos que no presenten EPA necesitarán de concentraciones continuas en suero para ejercer su acción (42, 46, 75).

Asimismo en relación con el EPA se han encontrado algunos efectos asociados, comentados en el apartado siguiente, igualmente importantes a la hora de encontrar un régimen de dosificación idóneo.

2.5.2. Otros efectos relacionados con el EPA

1- Mayor susceptibilidad a la acción de leucocitos (Postantibiotic Leukocyte Enhancement o PALE)

Este fenómeno hace referencia a la mayor susceptibilidad de las bacterias en fase de EPA para ser fagocitadas por los leucocitos. El PALE fue observado por Mc.Donnald y Pruul (134) y más tarde por otros

investigadores (45, 112, 118) en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Este efecto ha sido también observado "in vivo" por Lam y cols. (112) quienes demostraron que las bacterias tratadas eran más vulnerables a los mecanismos de muerte de los PMN. Igualmente Craig y Gerber (73) demostraron también el PALE "in vivo", al observar que bacterias en fase de EPA inyectadas en muslos de ratones normales, sin inmunodeprimir, eran eliminadas antes que bacterias en fase de crecimiento.

Aunque todavía queda mucho por investigar en este campo, todos estos estudios sugieren que el PALE es un fenómeno que ocurre "in vivo", y que las defensas del huésped contribuirían junto con el EPA al éxito de la dosificación intermitente.

2- Cambios morfológicos en las bacterias expuestas a antimicrobianos.

Lorian (118, 120, 121, 122) demostró que bacterias expuestas a betalactámicos o quinolonas cambian su peso y morfología (los bacilos se convierten en filamentos y los cocos aumentan de tamaño) y ya se ha señalado anteriormente que este fenómeno puede servir de criterio para la evaluación del EPA. Asimismo se ha comprobado que estas bacterias alteradas en su morfología son más susceptibles a los mecanismos bactericidas de los PMN (PALE) (121). Hay que añadir que, "in vivo", la elongación de los bacilos supondría la pérdida de un importante factor de virulencia, la adhesividad, puesto que los filamentos perderían las fimbrias (como es el caso de E.coli)(30).

3- Disminución de la actividad bactericida durante el EPA tras una nueva dosis de antimicrobiano (efecto refractario)

Hay evidencias de que los microorganismos durante la fase de EPA son menos susceptibles a la actividad bactericida de ciertos antimicrobianos (73, 200). Según estos estudios, el grado de inhibición parece ser dependiente del microorganismo (más en bacilos Gram-negativos que en S.aureus) y del antimicrobiano (betalactámicos y trimetoprim más que aminoglicósidos). Aunque se necesitan más datos tanto de experimentos "in vitro" como "in vivo" que demuestren más eficazmente este efecto en los antimicrobianos estudiados, estas observaciones podrían tener su importancia en la dosificación de la terapia combinada.

4- Aumento de la actividad bactericida durante el EPA con concentraciones de antimicrobiano menores de la CMI

Gerber y Craig (1981) aparentemente demostraron lo contrario con penicilinas, según hemos comentado en el apartado anterior, sin embargo ellos examinaron la acción bactericida a concentraciones por encima de la CMI. La supresión del recrecimiento de bacterias en fase de EPA con concentraciones de sub-CMI ha sido observada con betalactámicos (54, 133, 149, 151, 173). "In vitro" este es un fenómeno que no suele suceder ya que el antimicrobiano es eliminado casi por completo por dilución, enzimas, etc.; pero "in vivo", especialmente con antimicrobianos de vida media muy larga, es difícil excluir el posible efecto que tengan las sub-CMI sobre las bacterias en fase de EPA. Con algunas nuevas quinolonas se ha comprobado actividad bacteriostática e incluso bactericida en bacterias con fase de crecimiento logarítmico y concentraciones de 1/2 y 1/4 CMI (4).

IV. MATERIAL Y METODO

1. MATERIAL

El material utilizado fué el siguiente:

1.1. MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas tanto en los experimentos "in vitro" como "in vivo" fueron:

- Escherichia coli ATCC 25922.
- Staphylococcus aureus ATCC 25923.

Las cepas se conservaron en placas de agar de Müeller-Hinton a 0 °C, llevándose a cabo resiembras en medio fresco cada 5-6 días. Para el día del experimento se inocularon en caldo o agar de M-H, dependiendo del tipo de trabajo, incubándose a 37 °C durante 16-18 horas.

1.2. ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos utilizados en los ensayos fueron: gentamicina, netilmicina, isepamicina, ciprofloxacino, fleroxacino y lomefloxacino, suministrados por Schering Plough S.A. (los tres primeros), Bayer S.A., Roche S.A., y Searle Ibérica S.A., respectivamente. El suministro de los fármacos se realizó en forma de polvo valorado cuyas potencias respectivas fueron de 60,6%, 58.6%, 65,7%,

86.2%, 100% y 0.6%, . Los stocks fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del laboratorio farmacéutico, y se separaron en alícuotas de 1 ml cada una, conservándolas a -18 °C hasta su utilización. Para cada ensayo se utilizó una alícuota que se diluyó en solución salina estéril hasta conseguir la concentración requerida.

1.3. ANIMALES

Se utilizaron ratones hembras BALB/C (suministrados por PANLAB S.A. y que pertenecían al animalario del departamento de Microbiología de la facultad de Medicina), de peso 25-27 g y edad entre 18-20 semanas. Los animales se mantuvieron con aporte de comida y agua "ad libitum" y a temperatura constante, vigilando que no presentaran patología alguna.

1.4. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados, preparados según las instrucciones del fabricante, fueron:

- Caldo de Müller-Hinton (OXOID)
- Agar de Müller-Hinton (OXOID)
- Agar iso-sensitest (OXOID)

1.5. OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS

- *Ciclofosfamida (Genoxal, de Laboratorios FUNK) en viales de 200 mg para diluir en 10 ml de agua destilada.*
- *Solución salina: se preparó diluyendo 9 g de ClNa (PANREAC) en 1 L de agua destilada.*
- *Solución PBS (Buffer Fosfato Salino): suministrada en forma de polvo preparado y diluída en agua destilada según instrucciones del fabricante con un pH de 7.2 (BIOMÉRIEUX)*
- *Eter anestésico (PANREAC).*
- *Metanol (PANREAC).*
- *Arena de mar estéril (PANREAC).*

1.6. INSTRUMENTOS, APARATOS Y MATERIAL FUNGIBLE

Los aparatos e instrumentos utilizados eran los disponibles en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina:

- *Estufas Heraeus*
- *Hornos Heraeus*
- *Autoclave (Selecta Mod. Cino-Matic); la esterilización se llevó a cabo en un tiempo de 20 minutos a 121 °C (1.2 atm.)*
- *Baños con agitación (Selecta Unitronic Mod. 320 OR)*
- *Centrífuga (Selecta Mod. Meditronic)*
- *Espectrofotómetro (HITACHI Mod. U-1100)*
- *Micropipetas (Gibson)*

- *Vórtex (Heidolph Reux 2000)*
- *Morteros de porcelana (Comercial Anger)*
- *Material quirúrgico: tijeras, bisturí, pinzas (Comercial Anger)*
- *Calibre (Fowler Ultra-Call, Sylvac)*
- *Jeringuillas de insulina (Plastipak, Becton Dickinson)*
- *Placas Petri de 15 cm (Droquima) y 9 cm de diámetro (Soria Greiner)*
- *Tubos de vidrio de 10.3 ± 0.2 mm. de diámetro (Comercial Anger)*

2.METODO

2.1. ESTUDIOS "IN VITRO"

2.1.1. Recuento de microorganismos

La concentración de microorganismos se calculó mediante la técnica de recuento en placa, descrita por varios autores (101); este método consiste en hacer una dilución seriada en solución salina al 0.9% del cultivo inicial, obteniendo una serie de tubos que contienen cada uno 10 veces menos concentración que el anterior. A continuación se sembraron 25 µl de cada tubo en placas de agar M-H, contándose a las 18-24 horas el número de UFC (unidades formadoras de colonias) y calculándose entonces la concentración del cultivo inicial. No se tuvieron en cuenta las placas con un número de colonias por debajo de 20 o por encima de 200.

2.1.2. Cálculo de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Bactericidas (CMI y CMB).

La técnica empleada fue la de Macrodilución en tubo (101), método que consiste en los siguientes pasos:

- primero se preparan una serie de tubos que contienen 1 ml de caldo M-H y concentraciones de antimicrobiano al duplo, es decir, cada tubo tiene doble concentración que el siguiente. El tubo con mayor concentración era

de 16 µg/ml y el de menor, de 0.0075 µg/ml. El tubo control contenía 1 ml de medio M-H sin antimicrobiano.

- en segundo lugar se añadió a cada tubo 1 ml de inóculo. Este se preparó ajustando la turbidez de un tubo con solución salina y microorganismos en fase logarítmica de crecimiento al tubo n° 1 de la escala de Mc. Farland (3×10^8 UFC/ml) y diluyendo después hasta conseguir una concentración de 10^5 UFC/ml en caldo M-H.

La CMI se calculó, transcurridas 18-24 horas en estufa a 37 °C, como la concentración del primer tubo que no presentaba crecimiento (turbidez) en comparación con el tubo control.

Para el cálculo de la CMB, se sembraron con un asa de platino en placas con agar de M-H unos 10 µl del contenido de cada tubo por encima del de la CMI, y se incubaron 18-24 horas en estufa a 37 °C. Se tomó el valor de la CMB como la concentración del tubo que había destruido el 99.9% de los microorganismos.

Este proceso se hizo, como mínimo, por duplicado para todos los antimicrobianos (gentamicina, netilmicina, isepamicina, ciprofloxacino, lomefloxacino y fleroxacino) con las dos cepas (*E. coli* y *S. aureus*).

2.1.3. Efecto postantibiótico (EPA): Técnica de dilución en caldo

La cuantificación del EPA se realizó en un cultivo de microorganismos que se expusieron a la acción del antimicrobiano durante 1 hora, y comparando después el crecimiento con un cultivo control (67).

Los cultivos contenían 50 ml de caldo M-H al que se le añadieron microorganismos (en fase logarítmica) alcanzándose una concentración de 10^7 UFC/ml (absorbancia de 0.06 a 580 nm). Las concentraciones de antimicrobiano que se añadieron fueron de 4 mg/l (para gentamicina y netilmicina), 7 mg/l (isepamicina), y 6 mg/l (fleroxacino y lomefloxacino) para los dos microorganismos; por último, 6 mg/l (ciprofloxacino con *S. aureus*) y 0.5 mg/l (ciprofloxacino con *E. coli*). Para cada concentración y microorganismo se mantuvo un matraz como control, añadiendo el mismo volumen de solución salina; todos los matraces se incubaron a 37 °C en baño con agitación durante 1 hora, al cabo de la cual se procedió a retirar el antimicrobiano mediante la técnica de dilución (100). Para ello se tomaron 50 µl de cada matraz (control y tratados) añadiéndoselos a 50 ml de caldo M-H (dilución 1:1000), con lo que el efecto del antimicrobiano quedaba anulado. Después los matraces fueron incubados 7 horas, de nuevo a 37 °C en baño con agitación.

Todas las curvas de crecimiento y de EPA se elaboraron a partir de recuentos bacterianos que se hicieron cada hora desde el tiempo 0 (adición del antimicrobiano) hasta la 7ª hora. Este proceso se repitió tres veces con cada antimicrobiano y cada microorganismo (*S. aureus* y *E. coli*).

El cálculo de la duración del EPA se efectuó utilizando la fórmula descrita por Mc. Donnald (133):

$$EPA = T - C$$

donde:

T = tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar 1 logaritmo su concentración a partir del tiempo 0 (dilución del antimicrobiano).

$C =$ tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar 1 logaritmo su concentración a partir del tiempo 0.

La duración del EPA se tomó como la media de los tres experimentos \pm el error estándar, y se consideró significativo si era mayor de 30 minutos (133).

2.1.4. Efecto Bactericida

Se utilizaron las curvas de EPA para su realización. El efecto bactericida o máxima muerte bacteriana se calculó como la diferencia, en \log_{10} , entre el cultivo control y el que contenía antimicrobiano, tomada en la hora 1 (momento del lavado del antimicrobiano) (163).

2.1.5. Efecto "in vitro" de las sub-CMI de lomefloxacino sobre E.coli en fase de EPA

Un cultivo en fase logarítmica de E.coli fue pre-expuesto durante dos horas a una concentración de lomefloxacino de 5 mg/l (la misma que en los experimentos de EPA "in vivo"). Después se eliminó el antibiótico efectuando una dilución 1:1000 con caldo M-H fresco y este cultivo, que contenía 0.005 mg/l (0.01*CMI) de lomefloxacino, se dividió en 5 alícuotas, permaneciendo una de ellas como control. A continuación, se procedió a añadir lomefloxacino a las otras 4 alícuotas dando una concentración final de 0.0625 mg/l (1/8 * CMI), 0.125 mg/l (1/4 * CMI), 0.25 mg/l (1/2 * CMI) y 0.5 mg/l (1 * CMI). Durante las 8 horas siguientes se mantuvieron los cultivos en baño a 37°C y con agitación, haciéndose recuento

bacteriano cada hora a partir de la eliminación del antibiótico (149, 151). Este proceso se hizo por duplicado para dicho antimicrobiano y E.coli.

2.2. ESTUDIOS "IN VIVO"

Para el estudio del EPA "in vivo", se utilizó un modelo de infección en muslo de ratón neutropénico descrito por varios autores (43, 75, 80, 201, 203).

2.2.2. Efecto Postantibiótico

Se procedió a la evaluación del EPA, según el método descrito por Vogelmann y cols., mediante los siguientes pasos a continuación (203):

A) Neutropenia

Los ratones se inmunodeprimieron con dos dosis de 150 y 100 mg/kg de ciclofosfamida (vía intraperitoneal) en los días 0 y 3 (61, 75).

Previamente a la aplicación de este modelo se había comprobado la eficacia de la ciclofosfamida como inmunodepresor en el ratón, alcanzando un porcentaje de reducción de leucocitos del 70-84% en el día del experimento del EPA (día 4), lo que permite prácticamente anular el sistema inmunológico y evitar una posible interferencia en la infección bacteriana.

B) Infección en el muslo

La infección en el muslo se hizo por vía intramuscular, inyectando un volumen de 0.1 ml de caldo Müeller-Hinton con microorganismos en fase de crecimiento exponencial (E.coli) ó S. aureus); el número total de UFC inyectado fué de 10^6 - 10^7 UFC/ml. Los inóculos iniciales de todos los experimentos fueron comprobados y estandarizados mediante el espectrofotómetro correspondiendo un 85-90 % de Transmitancia a una longitud de onda de 580 nm, con una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/ml.

Cuando la dosis de un antimicrobiano era la misma para las dos bacterias, cada microorganismo era inyectado en un muslo distinto de un lote de 65 ratones, S. aureus en el izquierdo y E. coli en el derecho; pero si la dosis de antibiótico era diferente se preparaban grupos de 39 ratones, y cada uno era infectado en los dos muslos por la misma bacteria ya sea S.aureus o E.coli.

Este tiempo se tomó como el T_2 .

C) Tratamiento antimicrobiano

Al cabo de 2 horas de la infección en el muslo, los ratones fueron separados en 2 grupos:

A uno de ellos (de 35 ratones cuando tenían un microorganismo distinto en cada muslo o de 21 con el mismo) se les inyectó por vía

subcutánea en el muslo un volumen de 0.2 ml de solución salina y antibiótico en dosis de 4 mg/kg para gentamicina y netilmicina y 7 mg/kg para isepamicina para las dos bacterias; y 4 y 0.5 mg/kg para ciprofloxacino, 7 y 5 mg/kg lomefloxacino y fleroxacino, con S.aureus y E.coli, respectivamente. La elección de estas dosificaciones se hizo teniendo en cuenta las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del antimicrobiano, así como su poder bactericida "in vitro".

El otro grupo permaneció como control (de 30 ratones cuando tenían los dos microorganismos distintos o de 21 con el mismo) y se les inyectó un volumen igual de solución salina.

Este punto se tomó como tiempo 0 del experimento.

D) Sacrificio de los animales y extracción de los muslos

Se sacrificaron 3-5 ratones (por dislocación cervical bajo anestesia) por cada tiempo que se indica a continuación:

- grupo Control: en las horas 0 (administración del antimicrobiano), 2, 4, 6, 8 y 10.

- grupo de Tratados: en cada una de las horas 1^a a 4^a y posteriormente en las horas 6, 8 y 10.

Después del sacrificio de cada animal y con ayuda de material quirúrgico (pinzas, bisturí y tijeras) se extrajeron los muslos del ratón,

separando la piel y cortando el músculo en pequeños trozos que se llevaron a un mortero de porcelana estéril, añadiéndole 9 ml de solución salina (dilución 1:10 del número de bacterias en el muslo) y homogeneizando durante 5-7 minutos con arena de mar estéril; a continuación se tomó el sobrenadante del mortero y se procedió al recuento de microorganismos.

E) Recuento del número de UFC en el muslo del ratón

A partir del homogeneizado (que se consideró como dilución 1:10 del número real de UFC en el muslo) se procedió a realizar el recuento de UFC por el método (ya descrito en los estudios "in vitro") de banco de diluciones y recuento en placa. Se obtuvieron así las concentraciones de microorganismos por muslo en los distintos tiempos y se elaboró una gráfica con los datos.

F) Cálculo del tiempo en el que los niveles séricos de antimicrobiano están por encima de la CMI

F.1. Aminoglicósidos

Las concentraciones de antimicrobiano en suero y los tiempos en que están por encima de la CMI fueron calculados y suministrados por Schering Plough S.A., proveedora de los antimicrobianos.

F.2. Fluorquinolonas

Los niveles de antimicrobiano en suero se determinaron por bioensayo utilizándose el método de difusión en agar de Grove y Randall (79a, 162, 167), ligeramente modificado y adaptado a nuestras necesidades:

- Elaboración de la recta estandar.

Se utilizaron placas Petri de 15 cm de diámetro con 70 ml de agar sensitivo y un microorganismo patrón sembrado en masa en una concentración de 10^5 - 10^6 UFC/ml, en nuestro caso *Escherichia coli* ATCC 25922. Una vez sólido el agar se procedió a hacer pocillos (3-4 por placa) de 10.3 ± 0.2 mm de diámetro con la boca de un tubo de vidrio, extrayendo el pedazo de agar con unas pinzas, todo ello realizado de la manera más estéril posible. Cada pocillo fué llenado con 300 μ l de una solución de PBS y antibiótico a distintas concentraciones, realizándose el ensayo por triplicado.

Las cargas de antimicrobiano fueron: 0.00468, 0.00937, 0.1875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, 19.2, 22.5 y 30 μ g (para ciprofloxacino); 0.00937, 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, 19.2, 22.5, 30, 45 y 75 μ g (para fleroxacino); 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, 19.2, 22.5, 30, 60 y 90 μ g (para lomefloxacino). Para cada recta estándar se realizaron pocillos control con 300 μ l de solución PBS.

Se incubaron las placas a 37°C y, transcurridas 24 horas, se midieron los halos de inhibición con un calibre, realizándose con los datos una regresión lineal y una recta de mínimos cuadrados (recta estándar) que

relacionaba el logaritmo de la carga y el diámetro del halo en milímetros.

- Muestras de suero de ratones neutropénicos.

Las muestras de suero se obtuvieron por centrifugación de la sangre (3500 rpm durante 10 minutos), extraída por el seno retroorbital, de ratones neutropénicos tratados con las mismas dosis de antimicrobiano vía s.c. que en el estudio del EPA "in vivo". La obtención de sangre se realizó a partir de la administración del antimicrobiano y durante 4 horas, la 1ª media hora cada 15 minutos y posteriormente cada 30 minutos hasta la 4ª. Se utilizaron 3 ratones por cada tiempo de extracción de sangre, haciendo un total de 30 ratones por cada ensayo de antimicrobiano-microorganismo (3 controles sin antimicrobiano y 27 tratados).

Una vez obtenidos los sueros se procedió a llenar 3-4 pocillos, por tiempo de extracción, en placas Petri preparadas de igual forma a la explicada para la recta estándar. Tras incubación a 37°C durante 24 horas, se midieron los halos de inhibición y se calculó la concentración de antimicrobiano correspondiente mediante la recta estándar y la ecuación de regresión lineal. Con estos datos se prepararon dos gráficas de niveles de concentración de antimicrobiano en suero ($\mu\text{g/ml}$) versus tiempo (h) por cada quinolona y dosis distinta.

El cálculo del tiempo en el que los niveles de antimicrobiano superan a la CMI se realizó interpolando, en los datos de diámetro del halo de inhibición obtenidos en los tiempos de extracción del suero, el diámetro teórico según la recta estándar, que corresponde a la CMI.

G) Cálculo del EPA

El cálculo del tiempo del efecto postantibiótico se realizó mediante la fórmula (163):

$$EPA = T - C$$

donde:

T = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones tratados aumenten 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en sangre descienden de la CMI.

C = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones controles aumenten 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

Se consideró EPA significativo si era mayor de 30 minutos (133).

H) Control de las concentraciones subinhibitorias y residuales del antibiótico en el muslo

Para demostrar que el retraso en el crecimiento bacteriano no se debía a la acción de antimicrobiano residual (subCMI, metabolitos, etc) se procedió a infectar en el muslo ratones inmunodeprimidos con bacterias en

fase logarítmica de crecimiento, justo en el momento en que los niveles de antimicrobiano en suero estaban por debajo de la CMI (101). El método fue el siguiente: se inmunodeprimieron grupos de 36 ratones, si más tarde se les inoculaba el mismo microorganismo en los dos muslos, y de 48 ratones si se inyectaba E.coli en un muslo y S.aureus en el otro, con las mismas dosis de ciclofosfamida empleadas en la evaluación del EPA. En el día del experimento se les administró a la mitad de los ratones, por vía subcutánea, una dosis de antimicrobiano igual que la utilizada en la evaluación del EPA, mientras que al otro mitad del grupo (control, 18 ó 24 ratones, según fuera con uno o dos bacterias distintas, respectivamente) se le inyectó el mismo volumen de solución salina. Al cabo del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero excedían la CMI, se infectaron todos los muslos de los ratones con 0.1 ml de caldo M-H con 10^6 - 10^7 UFC de S. aureus y/o E.coli en fase logarítmica de crecimiento.

Se sacrificaron 3-4 ratones, según el lote, cada hora desde la 1ª (la infección en el muslo es a las 0 horas) hasta la 6ª, se extrajeron los muslos y se procedió al recuento bacteriano en cada cada homogenizado, elaborándose una gráfica con los datos de log UFC/muslo vs. tiempo (h).

2.2.3. Efecto bactericida

El efecto bactericida, al igual que en los experimentos "in vitro", se calculó como la diferencia de crecimiento en \log_{10} entre el número de UFC de los controles y los ratones tratados, tomada en el tiempo en que los niveles de antibiótico descenden por debajo de la CMI (tiempo M) (163).

2.3. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó el siguiente tratamiento estadístico (99):

- Media aritmética

Sumando todas las concentraciones obtenidas y dividiendo por el número de muestras utilizadas en ese experimento.

- Error estándar

Se obtuvo dividiendo la desviación típica por la raíz cuadrada del número de datos menos uno. La desviación típica se calculó sumando las diferencias al cuadrado de todos los datos con su media, dividiendo por el número de datos y extrayendo la raíz cuadrada.

- Análisis de la varianza

La significación estadística se calculó por medio de un ordenador PC-3286 y un test de análisis de la varianza (ANOVA de 1 factor, test no pareado y con muestras independientes) incluido en el programa de estadística llamado ESTADIST.

- Recta de regresión

La recta de regresión basada en el método de mínimos cuadrados, se realizó en un ordenador PC-3286 con el programa de cálculo LOTUS 123.

V. RESULTADOS

1. ESTUDIOS "IN VITRO"

1.1. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS (CMI Y CMB)

*Las CMI y CMB de los antimicrobianos estudiados se muestran en la **tabla 1**, frente a S.aureus, y en la **tabla 2**, frente a E.coli.*

Los mayores valores para los dos microorganismos correspondieron a isepamicina (2 mg/l), y en menor grado lomefloxacino (1 mg/l), mientras que las CMI de ciprofloxacino y fleroxacino frente a E.coli resultaron las más bajas (0.12 y 0.015 mg/l respectivamente). El resto de combinaciones antimicrobiano-microorganismo se mantienen con CMI de 0.5 mg/l.

El valor de la CMI coincide con la CMB, lo que indica que todos los antimicrobianos tienen carácter bactericida.

1.2. EFECTO POSTANTIBIOTICO

*El efecto postantibiótico "in vitro" inducido por concentraciones superiores a la CMI de los microorganismos se muestra en las **tablas 1** y **2**.*

*A pesar de las diferencias individuales que se observan, los resultados estadísticos del análisis de la varianza, resumidos en la **tabla 5**, indican que no existen diferencias significativas debidas a los distintos microorganismos, ni por la*

utilización de una familia u otra de antimicrobiano.

Se puede decir que, en general, el EPA "in vitro" para aminoglicósidos y fluorquinolonas frente a S.aureus y E.coli oscila entre 1.2 y 2.4 h con un media de 1.8 h.

1.3. EFECTO BACTERICIDA

Los valores de efecto bactericida para los dos microorganismos se encuentran también en las **tablas 1 y 2**.

Destacan los mayores valores de isepamicina (3.8 log UFC/ml) y ciprofloxacino (aproximadamente 3 log UFC/ml) frente a los dos microorganismos, aunque estos datos no influyan en el resultado final del EPA puesto que, como se ha comentado en el apartado anterior, no había diferencias significativas entre ellos. Sí es un dato a tener en cuenta en el estudio del efecto postantibiótico ya que, elevados efectos bactericidas, supondrían un riesgo de "perder" el cultivo de microorganismos tratados por una acción bactericida rápida y altamente eficaz.

1.4. EFECTO DE LAS SUBCMI DE LOMEFLOXACINO "IN VITRO" FRENTE A E.COLI EN FASE DE EPA

En la **figura 23** están representadas las curvas de crecimiento de E.coli en fase de EPA, tras un tratamiento de 2 horas con 5 mg/l de lomefloxacino, y el posterior efecto que producen la CMI, 1/2 * CMI, 1/4 * CMI y 1/8 * CMI, sobre

estos microorganismos.

*Se observa una fuerte actividad bactericida prácticamente paralela, con las tres primeras concentraciones, desapareciendo el número de UFC/ml en 6-7 h a partir de la exposición. Con 1/8 * CMI la actividad es predominantemente bacteriostática durante unas 6 horas, al término de las cuales el cultivo se recupera, y en 2 h más, alcanza proporciones similares a las del cultivo control.*

2. RESULTADOS "IN VIVO"

2.1. RECTAS ESTANDAR

Las rectas estándar frente a la cepa patrón E.coli ATCC 25922 correspondientes a las fluorquinolonas se encuentran en la **figura 1**. Las ecuaciones de regresión lineal basadas en el método de mínimos cuadrados fueron las siguientes:

Ciprofloxacino

$$Y = 11.8988989732 * X + 39.751583866$$

$$(R^2 = 0.9789)$$

Fleroxacino

$$Y = 14.4135596037 * X + 29.2944097$$

$$(R^2 = 0.9899619074)$$

Lomefloxacino

$$Y = 12.9235684981 * X + 31.20741391$$

$$(R^2 = 0.9759829584)$$

donde Y es el diámetro del halo de inhibición y X es el logaritmo de la carga de antimicrobiano.

Según se aprecia en la figura 1, por la proximidad de las nubes de puntos a la recta y por lo cercano a la unidad de los coeficientes de determinación R^2 que determinan la variabilidad total atribuible a la variabilidad de la regresión, se deduce la existencia de una excelente relación lineal entre las dos variables X e Y.

2.2. CURVAS DE CONCENTRACION DE ANTIMICROBIANO EN SUERO DE RATON NEUTROPENICO

En las figuras 2, 3 y 4 se muestran las curvas de concentración en suero de ratón neutropénico de las fluorquinolonas después de una monodosis.

En general, los picos de concentración fueron alcanzados a la media hora de la administración del antimicrobiano, observándose para fleroxacino un mantenimiento durante aproximadamente una hora de los niveles más altos.

Al cabo de 3-4 horas las concentraciones de antimicrobiano en suero, situadas muy por debajo de la CMI para E.coli, ya no fueron detectadas, posiblemente por desaparición del antibiótico o debido a la falta de sensibilidad de la técnica empleada a tan bajos niveles.

2.3. TIEMPO EN EL QUE LOS NIVELES DE ANTIMICROBIANO ESTAN POR ENCIMA DE LA CMI

El tiempo en que los niveles de antimicrobiano sobrepasan la CMI están indicados en las tablas 3 y 4.

Como se indicó en el apartado de material y método, este tiempo fué suministrado por la casa comercial en el caso de los aminoglicósidos. Para las fluorquinolonas se utilizaron las rectas estándar y ecuaciones de regresión descritas en páginas anteriores.

Los aminoglicósidos se mantienen con valores homogéneos de

aproximadamente una hora, con isepamicina resultaron algo menores ya que las dosis utilizadas en relación con su CMI fueron menores. Los mayores valores corresponden a fleroxacino (2.2 h para S.aureus y 3.2 para E.coli) posiblemente, por su mayor vida media, seguidos de los de ciprofloxacino y lomefloxacino.

En resumen, las concentraciones de fluorquinolonas se mantienen más tiempo en suero por encima de las CMI que las de aminoglicósidos.

2.4. EFECTO POSTANTIBIOTICO

En las figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 están representadas las curvas de crecimiento de S.aureus y E.coli en muslos de ratones tratados y controles, indicándose también el EPA y el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

En las tablas 3 y 4 se resumen los tiempos de efecto postantibiótico y en la tabla 5 los resultados del análisis estadístico de la varianza comparando diferentes grupos de muestras "in vivo".

No hubo diferencias significativas entre todos los EPA debida a un microorganismo u otro. En cambio, sí la hubo respecto al antibiótico ($P = 0.005$), resultando mayores los EPA de aminoglicósidos que los de fluorquinolonas, a pesar de su menor tiempo de exposición a concentraciones sobre la CMI e incluso menor efecto bactericida como se verá más adelante; concretamente esta diferencia se comprueba de manera más pronunciada en S.aureus que en E.coli.

2.5. CONTROL DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS EN EL EPA

Las curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo", figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22 A, indican que no hay actividad antimicrobiana residual ya que el crecimiento bacteriano en las reinfecciones de ratones controles y tratados era paralelo.

En el caso de lomefloxacino frente a E.coli, representado en la figura 22 B, se comprobó actividad bactericida de las concentraciones subinhibitorias a partir del tiempo en que el antimicrobiano había descendido de la CMI (aproximadamente 2 h). El experimento se repitió entonces re infectando al cabo de 3 h, para comprobar si persistía el descenso en la curva de tratados. Se comprobó que realmente así era, por lo tanto, el EPA de lomefloxacino con E.coli no es verdadero sino que sería la suma del supuesto EPA (menor de 3 h) más la actividad debida a las concentraciones de subCMI.

*Posteriormente se realizaron una serie de curvas de crecimiento "in vitro" con E.coli en fase de EPA y distintas concentraciones de subCMI, en un intento de buscar una explicación a esta actividad subinhibitoria "in vivo" (ver apartado 1.4., figura 23). El resultado fué que las bacterias en fase de EPA poseen una susceptibilidad muy alta a concentraciones de $1/2$ y $1/4 * CMI$.*

2.6. EFECTO BACTERICIDA

El efecto bactericida queda resumido en las tablas 3 y 4 observándose una

actividad similar entre los aminoglicósidos pero menor que para las fluorquinolonas para E.coli; para S.aureus la diferencia fué menor, no obstante ciprofloxacino presentó mejor actividad bactericida que el resto de los antimicrobianos.

El mayor efecto bactericida se encontró en las fluorquinolonas frente a E.coli con una media de diferencia de 3 log UFC/muslo entre los controles y tratados.

VI. TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. CMI, CMB, concentración, efecto bactericida y EPA "in vitro" de los antimicrobianos estudiados frente a *S.aureus* ATCC 25923.

ANTIMICROBIANO	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)	CONCENTRACION (mg/l)	EFECTO BACTERICIDA (log UFC/ml)	EPA (h ± error standar)
<i>Gentamicina</i>	0.5	0.5	4	3.3	1.2 ± 1.1
<i>Netilmicina</i>	0.5	0.5	4	2.2	2.0 ± 0.2
<i>Isepamicina</i>	2	2	7	3.8	2.3 ± 0.6
<i>Ciprofloxacino</i>	0.5	0.5	6	2.8	2.0 ± 0.6
<i>Fleroxacino</i>	0.5	0.5	6	2	1.6 ± 0.4
<i>Lomefloxacino</i>	1	1	6	1.7	1.8 ± 0.8

TABLA 2. CMI, CMB, concentración, efecto bactericida y EPA "in vitro" de los antimicrobianos estudiados frente a *E.coli* ATCC 25922.

ANTIMICROBIANO	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)	CONCENTRACION (mg/l)	EFECTO BACTERICIDA (log UFC/ml)	EPA (h ± error standar)
<i>Gentamicina</i>	0.5	0.5	4	2.5	2.4 ± 1.0
<i>Netilmicina</i>	0.5	0.5	4	2.3	1.6 ± 0.3
<i>Isepamicina</i>	2	2	7	3.7	1.5 ± 1.0
<i>Ciprofloxacino</i>	0.015	0.015	0.5	3	2.1 ± 1.0
<i>Fleroxacino</i>	0.12	0.12	6	1.5	1.4 ± 0.4
<i>Lomefloxacino</i>	0.5	0.5	6	1.9	2.0 ± 0.1

TABLA 3. Tiempo sobre la CMI en suero, efecto bactericida y EPA "in vivo" de los antimicrobianos estudiados frente a *S.aureus* ATCC 25923.

ANTIMICROBIANO	CMI (mg/l)	DOSIS (mg/kg)	TIEMPO SOBRE LA CMI (h)	EFECTO BACTERICIDA (log UFC/muslo)	EPA (h ± error standar)
<i>Gentamicina</i>	0.5	4	1.1	1.8	3.6 ± 0.5
<i>Netilmicina</i>	0.5	4	1.1	1.8	4.2 ± 0.2
<i>Isepamicina</i>	0.5	7	0.7	0.8	5.1 ± 0.5
<i>Ciprofloxacino</i>	0.5	4	2.1	2.3	1.9 ± 0.2
<i>Fleroxacino</i>	0.5	7	2.2	1.5	1.8 ± 0.3
<i>Lomefloxacino</i>	1	7	1.5	1	3.0 ± 1.2

TABLA 4. Tiempo sobre la CMI en suero, efecto bactericida y EPA "in vivo" de los antimicrobianos estudiados frente a *E.coli* ATCC 25922.

ANTIMICROBIANO	CMI (mg/l)	DOSIS (mg/kg)	TIEMPO SOBRE LA CMI (h)	EFECTO BACTERICIDA (log UFC/muslo)	EPA (h ± error standar)
<i>Gentamicina</i>	0.5	4	1.1	1	3.1 ± 0.4
<i>Netilmicina</i>	0.5	4	1.1	1.1	3.5 ± 0.4
<i>Isepamicina</i>	2	7	0.7	0.9	4.5 ± 0.2
<i>Ciprofloxacino</i>	0.015	0.5	2.4	2.7	2.8 ± 0.6
<i>Fleroxacino</i>	0.125	5	3.2	3.2	2.3 ± 1.0
<i>Lomefloxacino</i>	0.5	5	1.6	3.0	3.5 ± 0.8

TABLA 5. Resultados del análisis estadístico de la varianza entre diferentes grupos de muestras.

GRUPOS DE MUESTRAS QUE SE COMPARAN	P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	GRUPO DE MAYOR MEDIA
<i>EPA in vitro - EPA in vivo</i>	0.0001	SI	<i>EPA in vivo</i>
<i>S.aureus - E.coli</i>	0.9	NO	
<i>Aminoglic. - F.Quinolon.</i>	0.8	NO	
<i>S.a. in vitro - S.a. in vivo</i>	0.02	SI	<i>S.a in vivo</i>
<i>E.c. in vitro - E.c. in vivo</i>	0.001	SI	<i>E.c. in vivo</i>
<i>S.a. in vitro - E.c. in vitro</i>	0.9	NO	
<i>S.a in vivo - E.c. in vivo</i>	0.9	NO	
<i>A. in vitro - F.Q. in vitro</i>	0.9	NO	
<i>A. in vivo - F.Q. in vivo</i>	0.005	SI	<i>A. in vivo</i>
<i>A. in vitro - A. in vivo</i>	0.0001	SI	<i>A. in vivo</i>
<i>F.Q. in vitro - F.Q. in vivo</i>	0.03	SI	<i>Q. in vivo</i>

Abreviaturas: *S.a.*, *S.aureus*; *E.c.*, *E.coli*; *A.*, aminoglicósidos; *F.Q.*, fluorquinolonas.

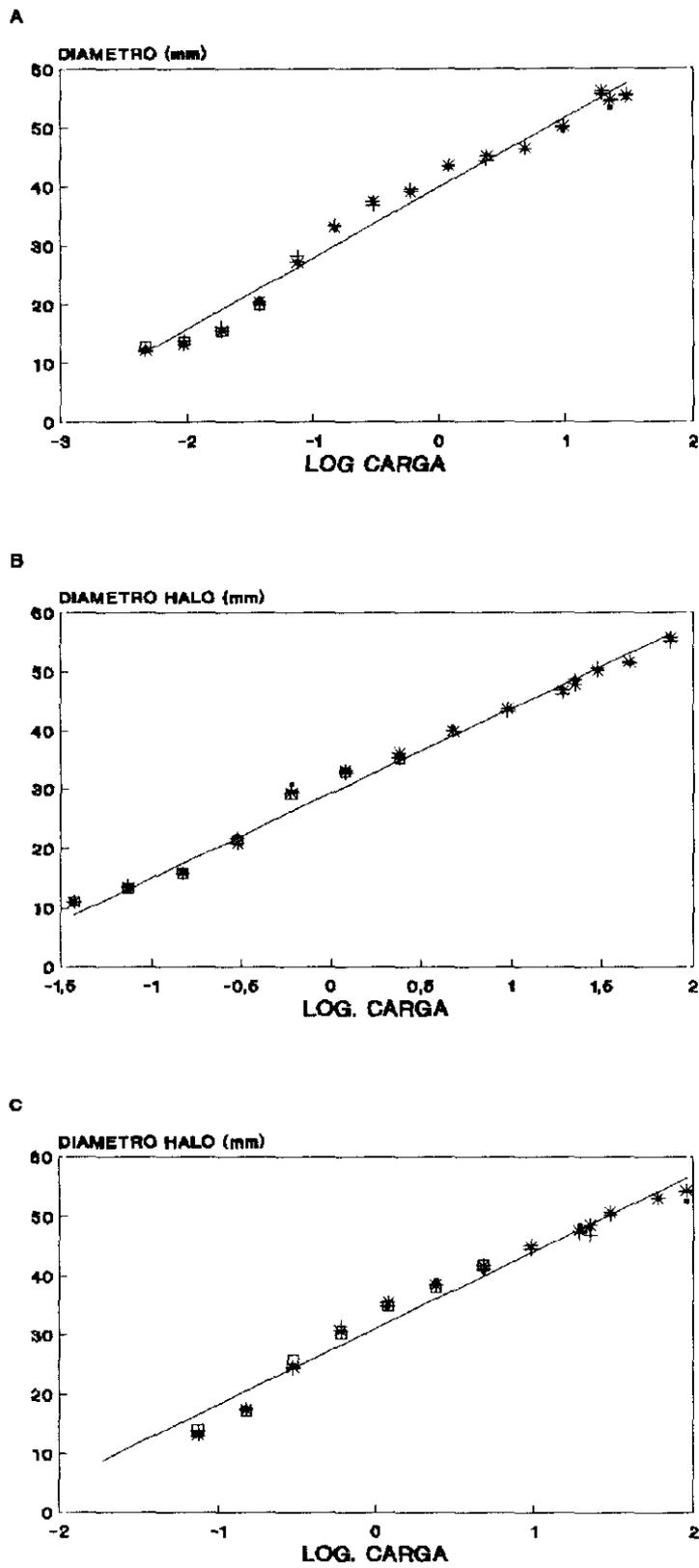


FIG.1 *Rectas estándar del logaritmo de la carga de ciprofloxacino (A), fleroxacinó (B) y lomefloxacino (C) frente al halo de inhibición de E.coli ATCC 25922.*

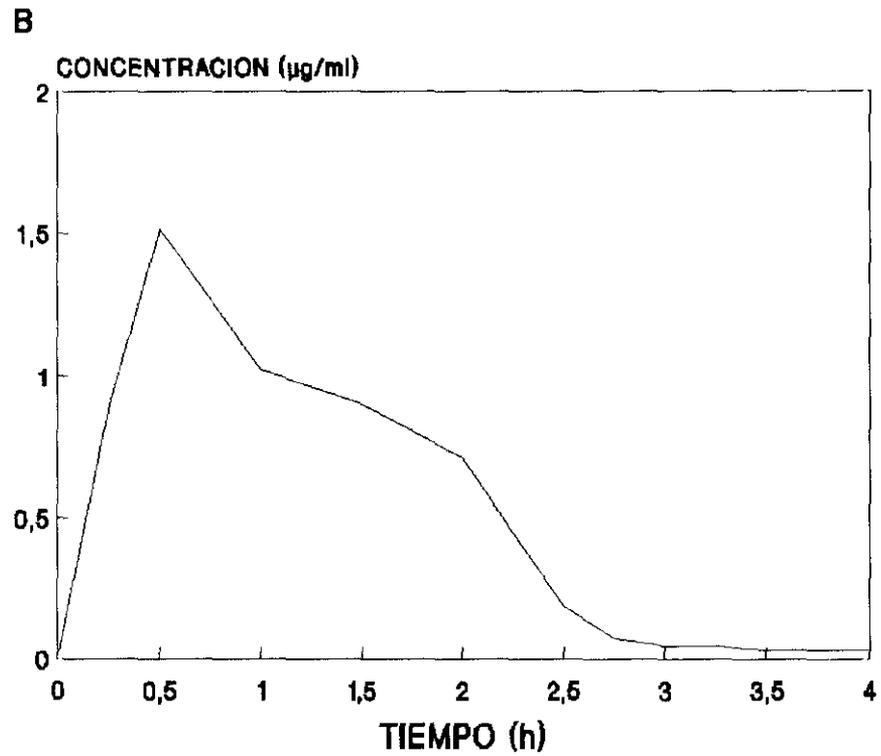
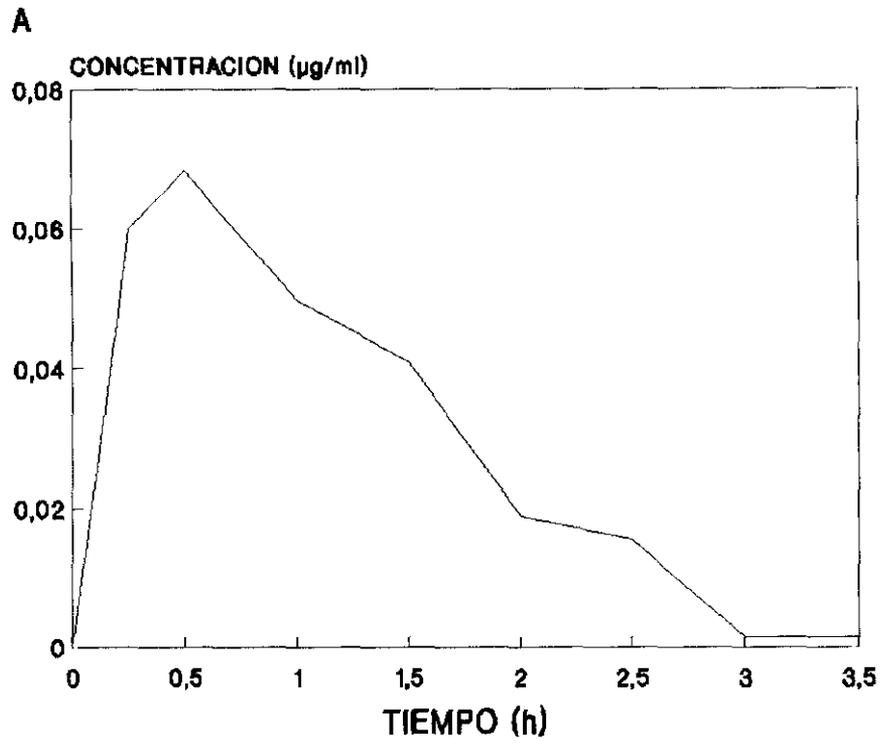


FIG.2 Curvas de concentración de ciprofloxacino ($\mu\text{g/ml}$) frente al tiempo (h) en suero de ratones neutropénicos después de una monodosis de 0.5 mg/kg (A) y 4 mg/kg (B).

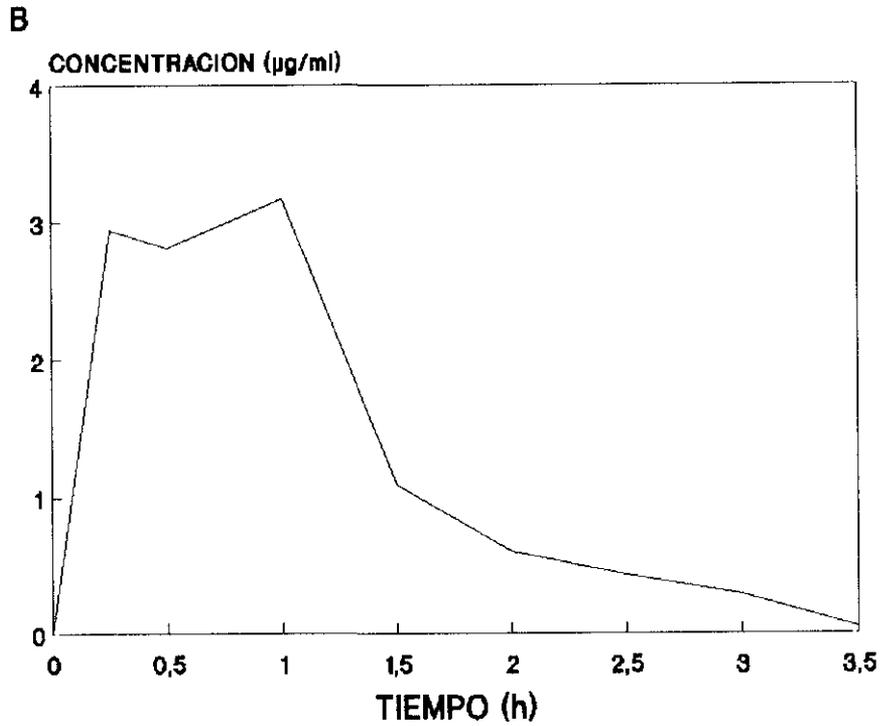
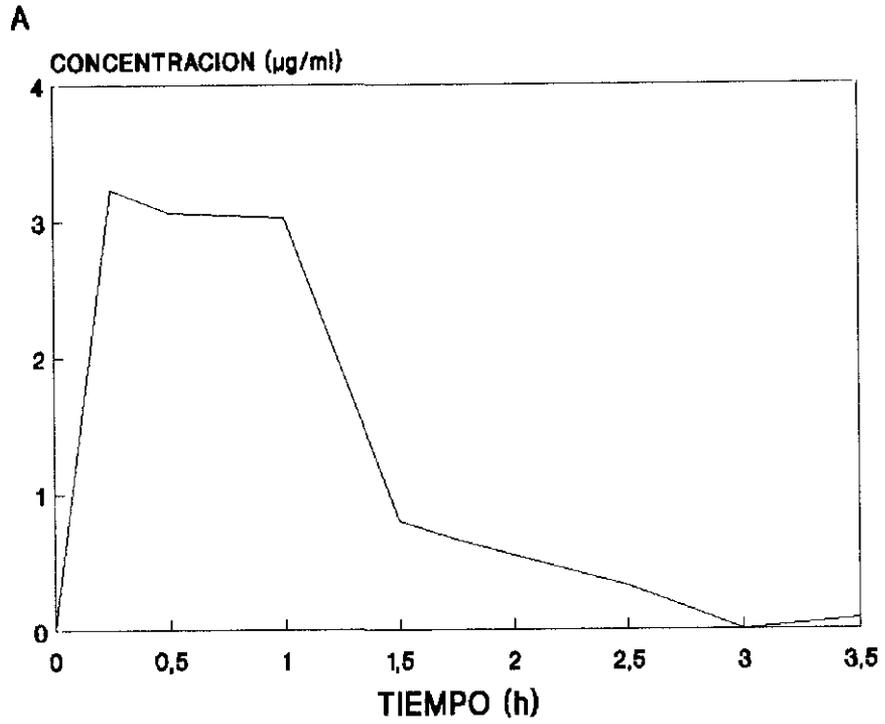


FIG.3 Curvas de concentración de fleroxacino ($\mu\text{g/ml}$) frente al tiempo (h) en suero de ratones neutropénicos después de una monodosis de 5 mg/kg (A) y 7 mg/kg (B).

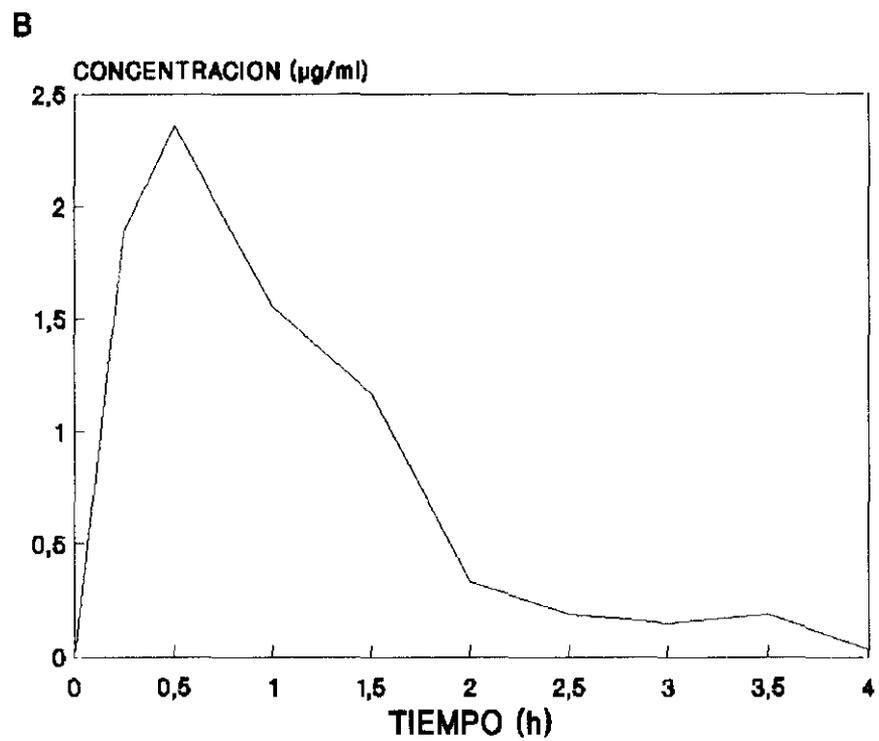
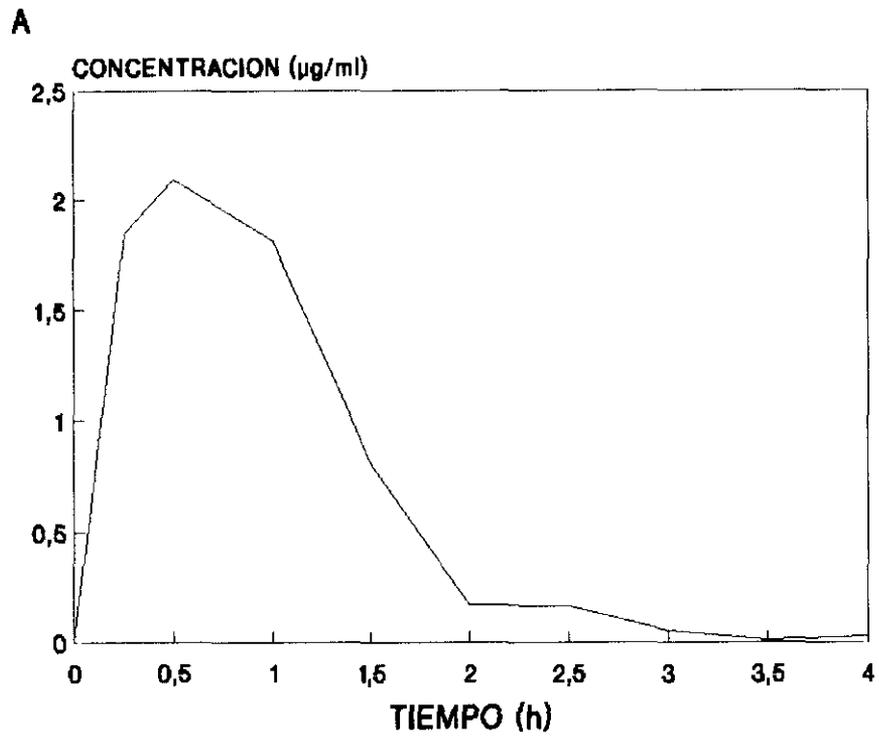


FIG.4 *Curvas de concentración de lomefloxacino ($\mu\text{g/ml}$) vs. tiempo (h) en suero de ratones neutropénicos después de una monodosis de 5 mg/kg (A) y 7 mg/kg (B).*

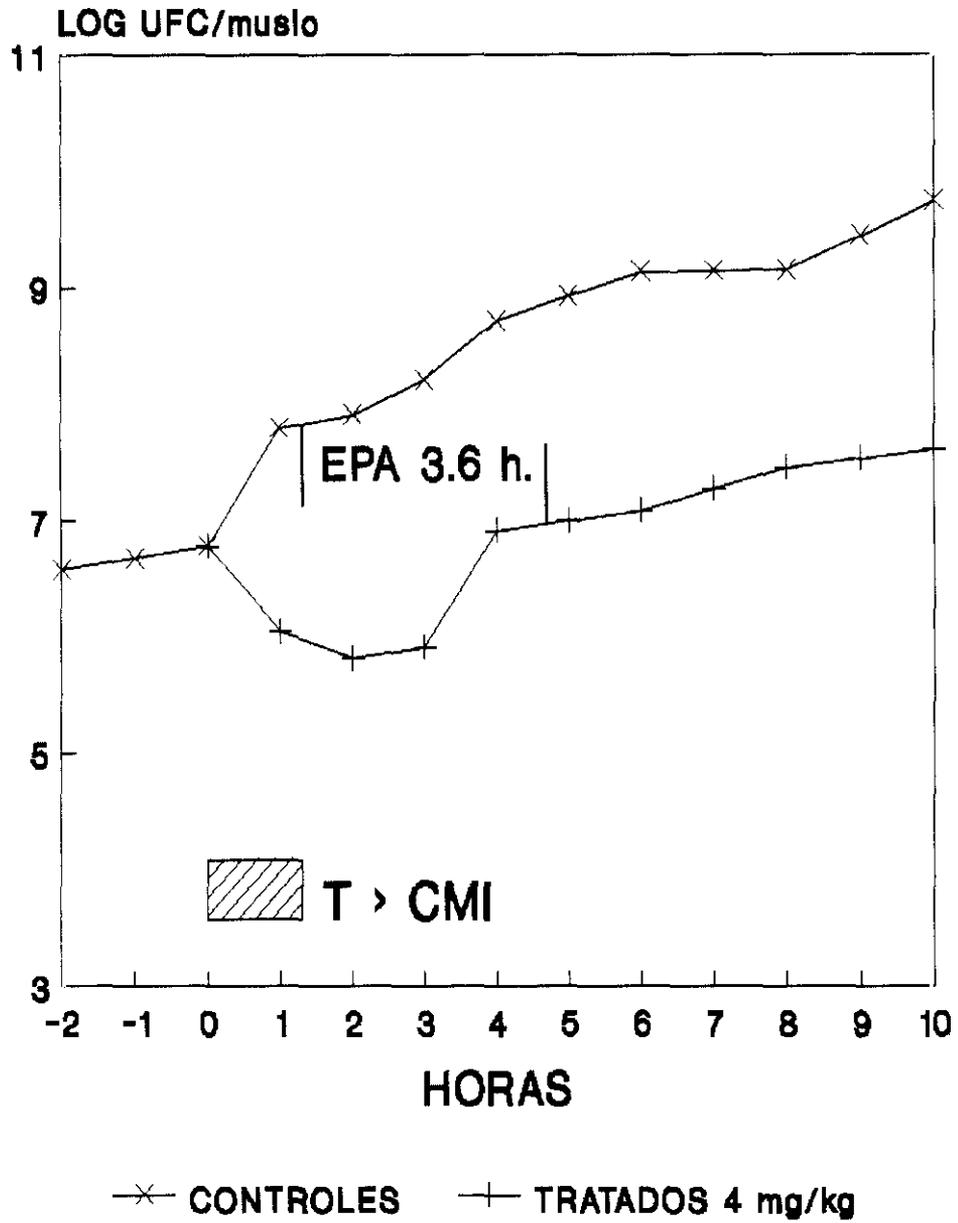


FIG.5 Efecto postantibiótico "in vivo" de gentamicina frente a *S.aureus*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

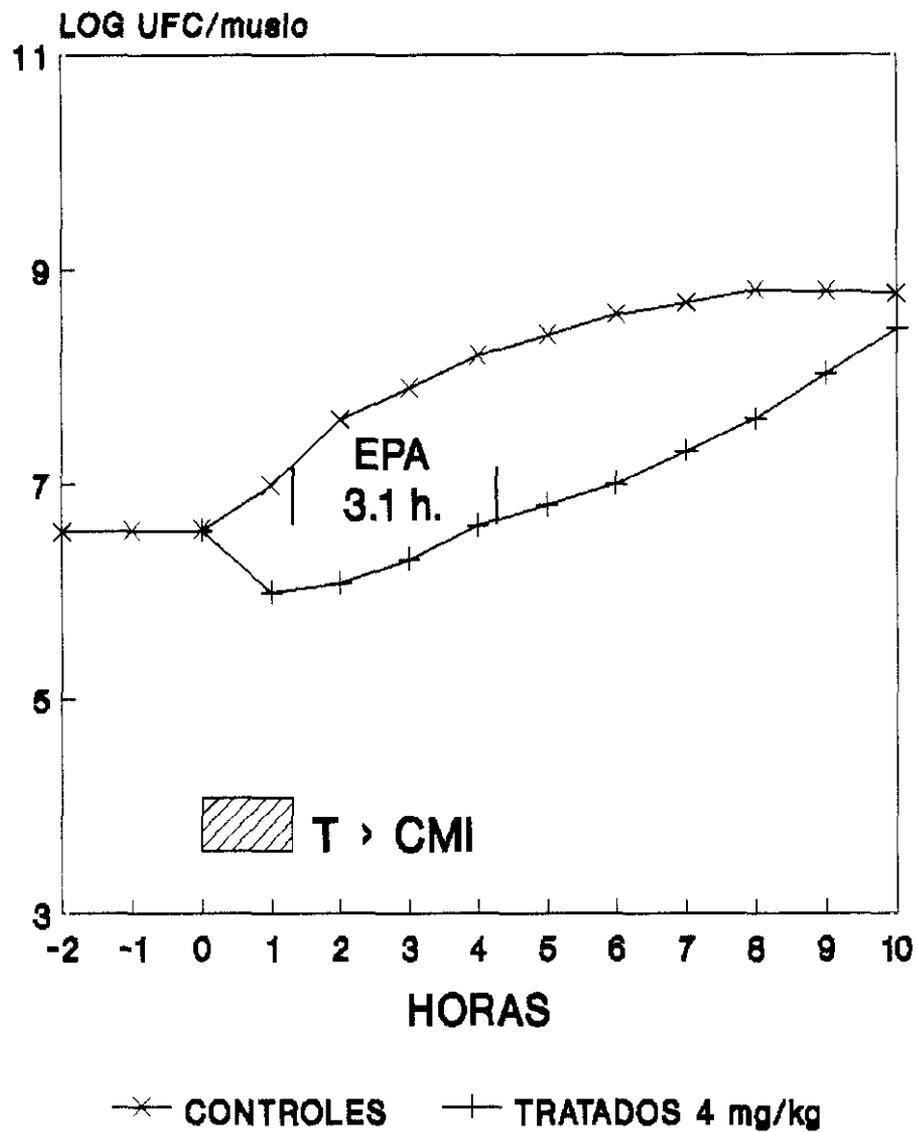


FIG.6 Efecto postantibiótico "in vivo" de gentamicina frente a *E.coli*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

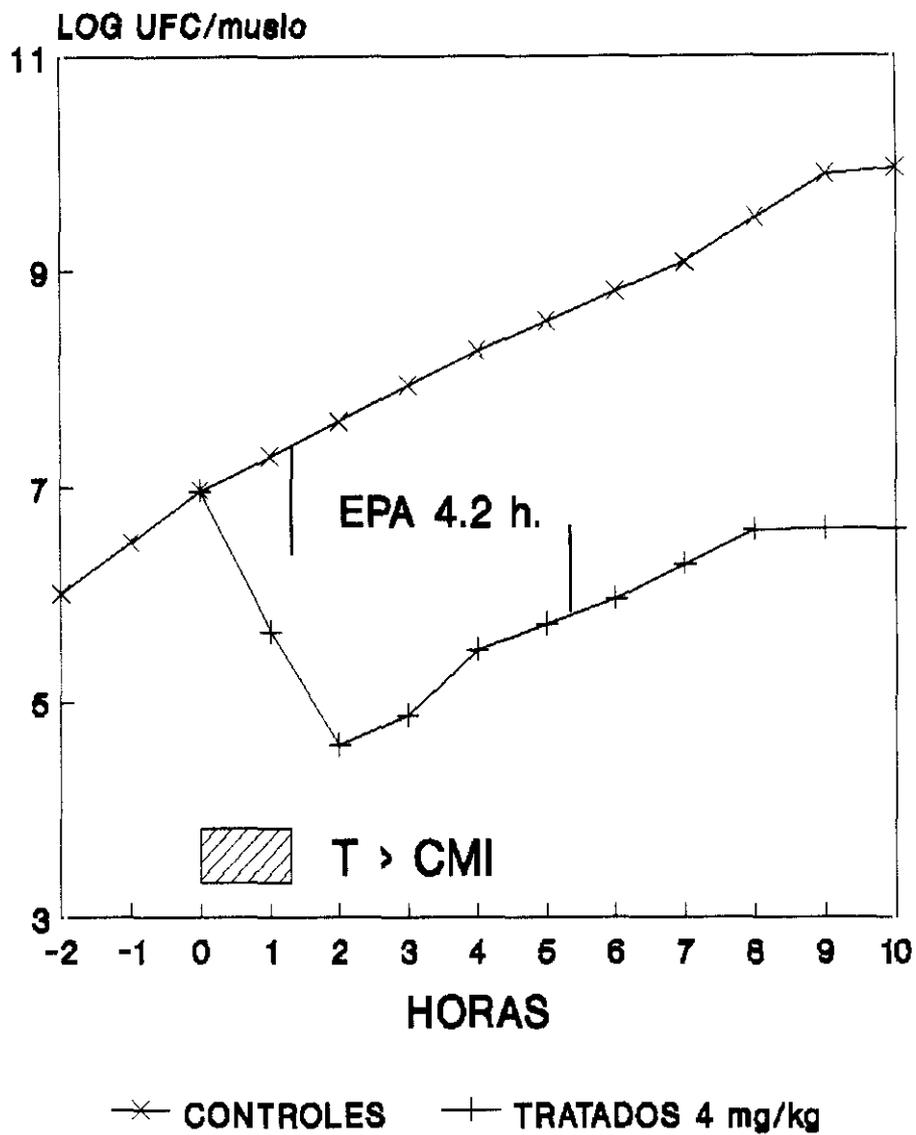


FIG.7 Efecto postantibiótico "in vivo" de netilmicina frente a *S.aureus*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

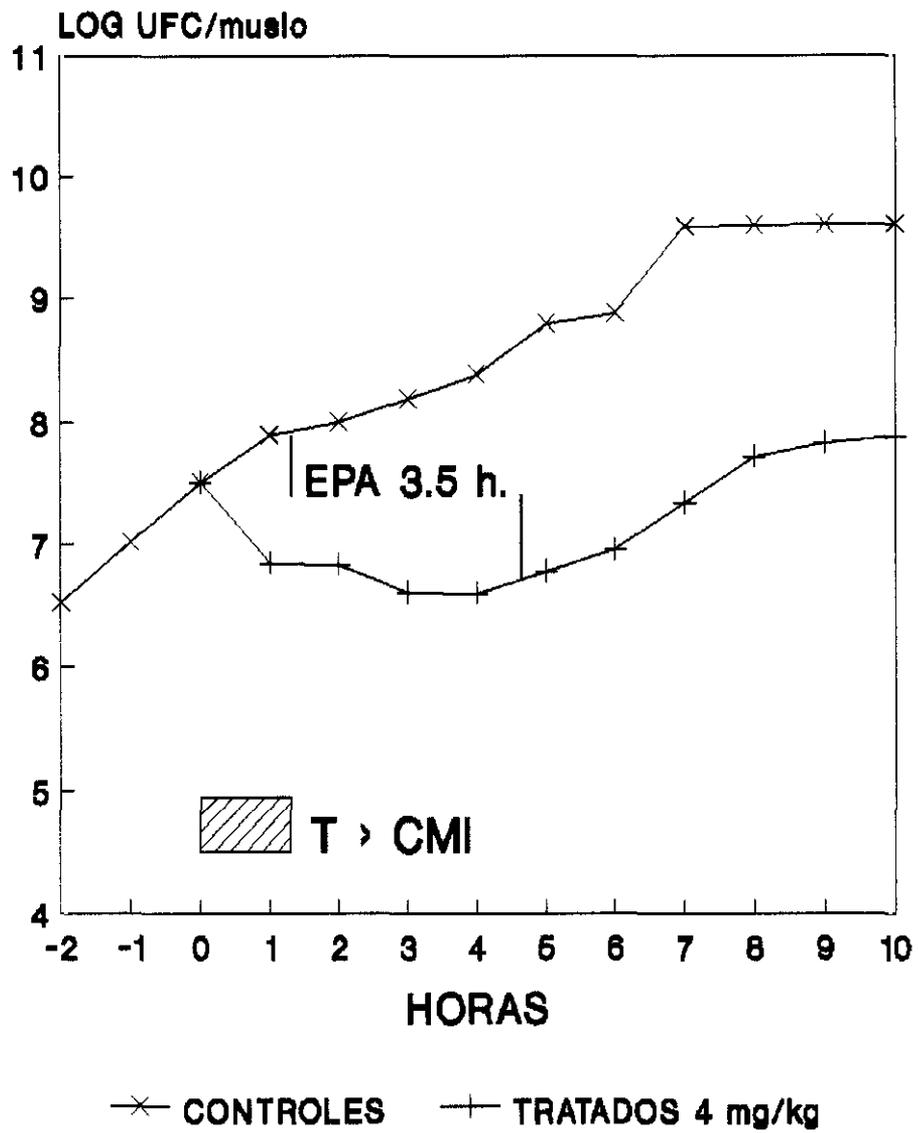


FIG.8 Efecto postantibiótico "in vivo" de netilmicina frente a *E.coli*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

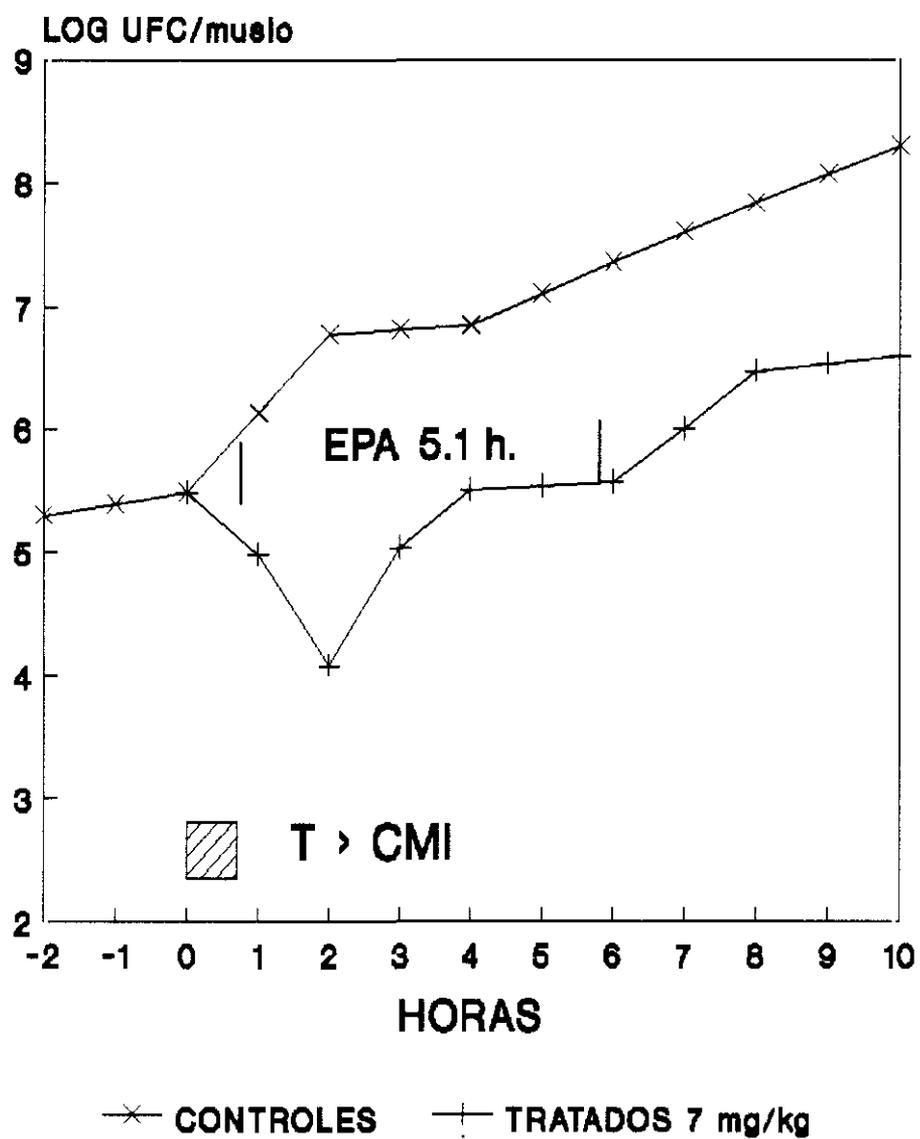


FIG.9 Efecto postantibiótico "in vivo" de isepamicina frente a *S.aureus*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

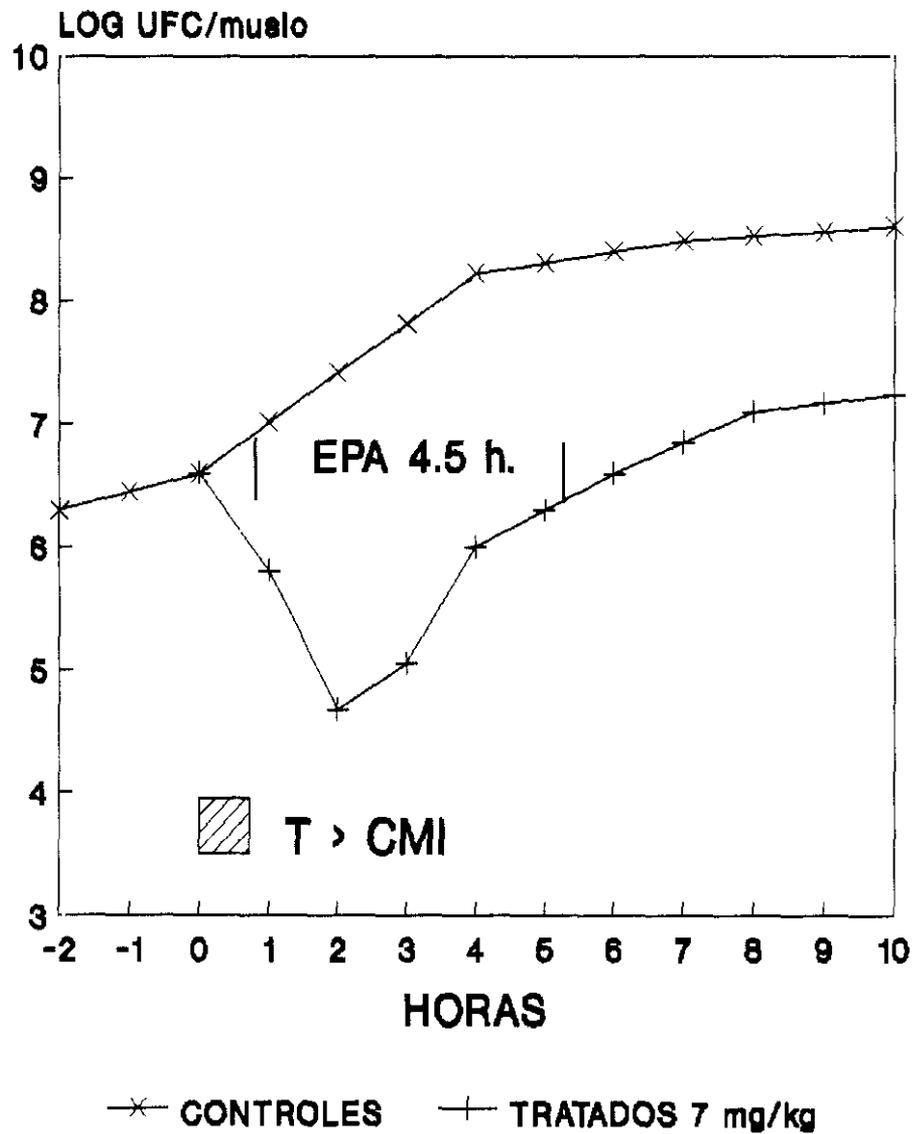


FIG.10 Efecto postantibiótico "in vivo" de isepamicina frente a *E.coli*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

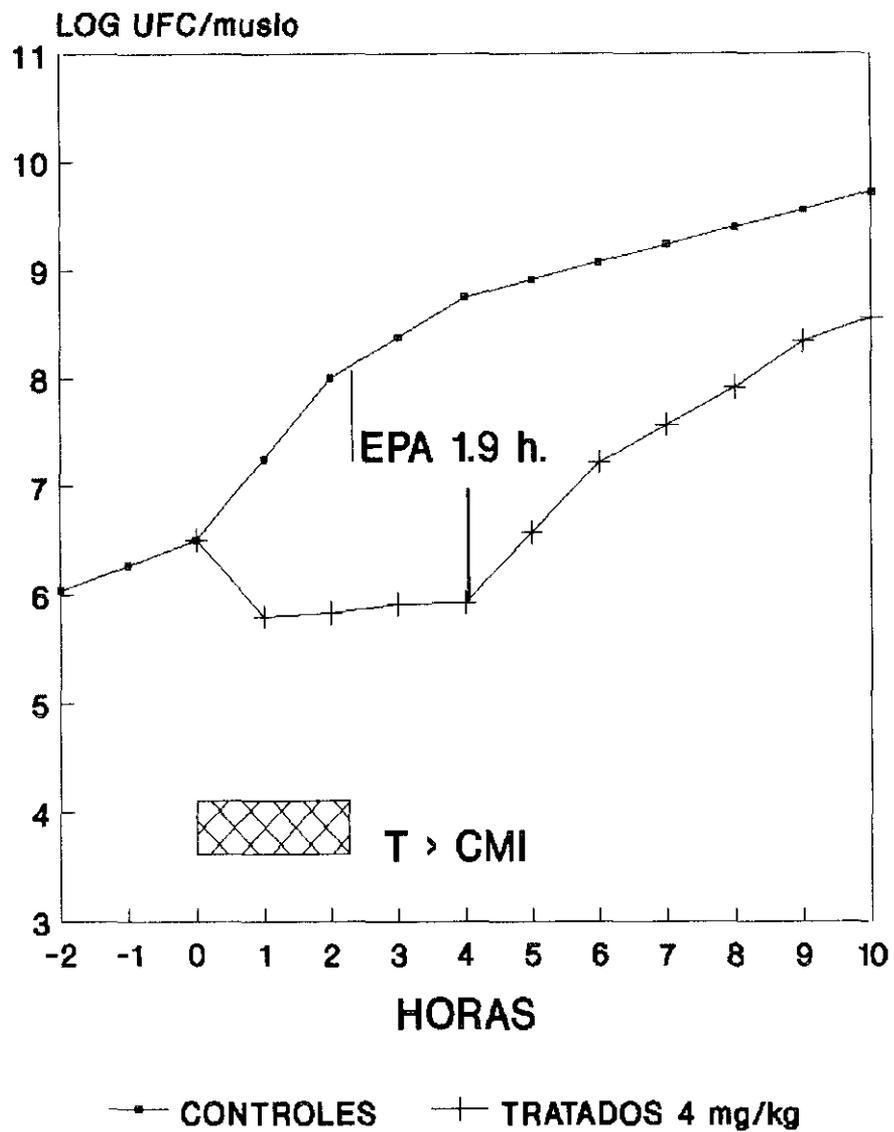


FIG.11 Efecto postantibiótico "in vivo" de ciprofloxacino frente a *S.aureus*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

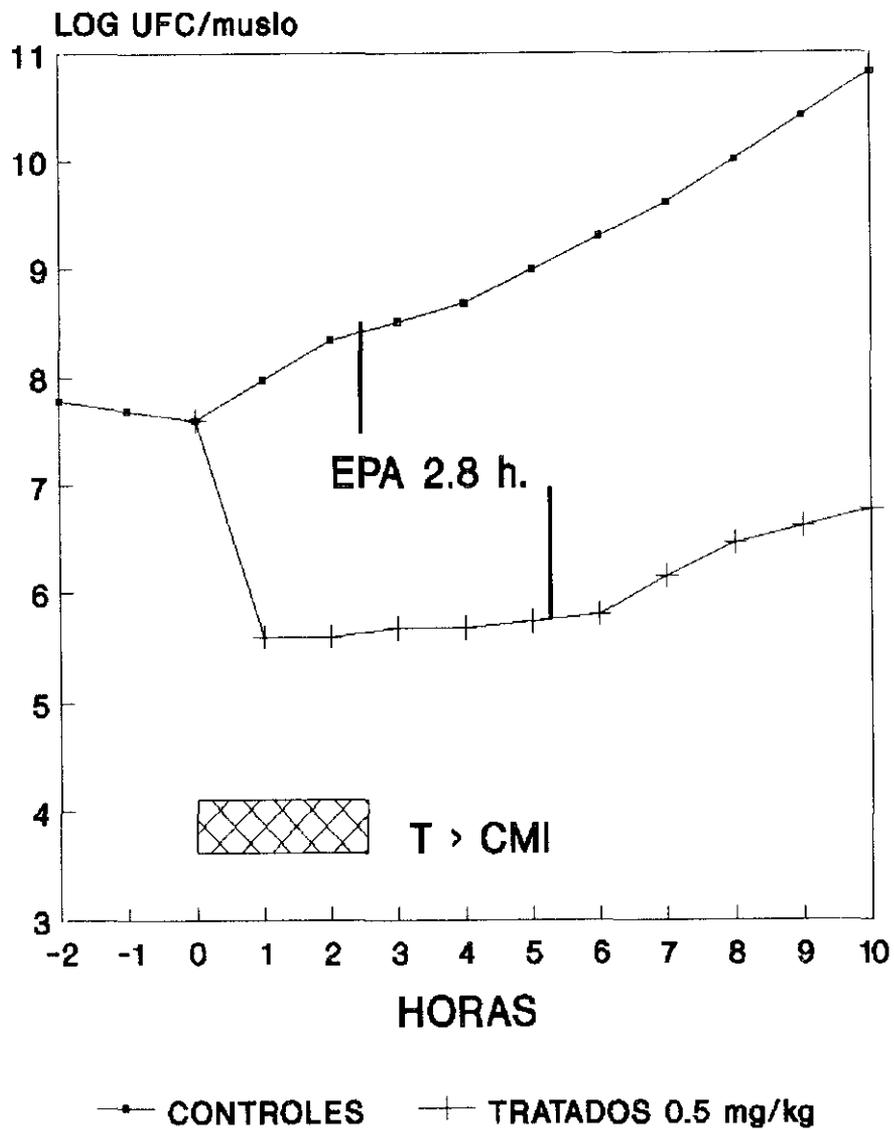


FIG.12 Efecto postantibiótico "in vivo" de ciprofloxacino frente a *E.coli*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

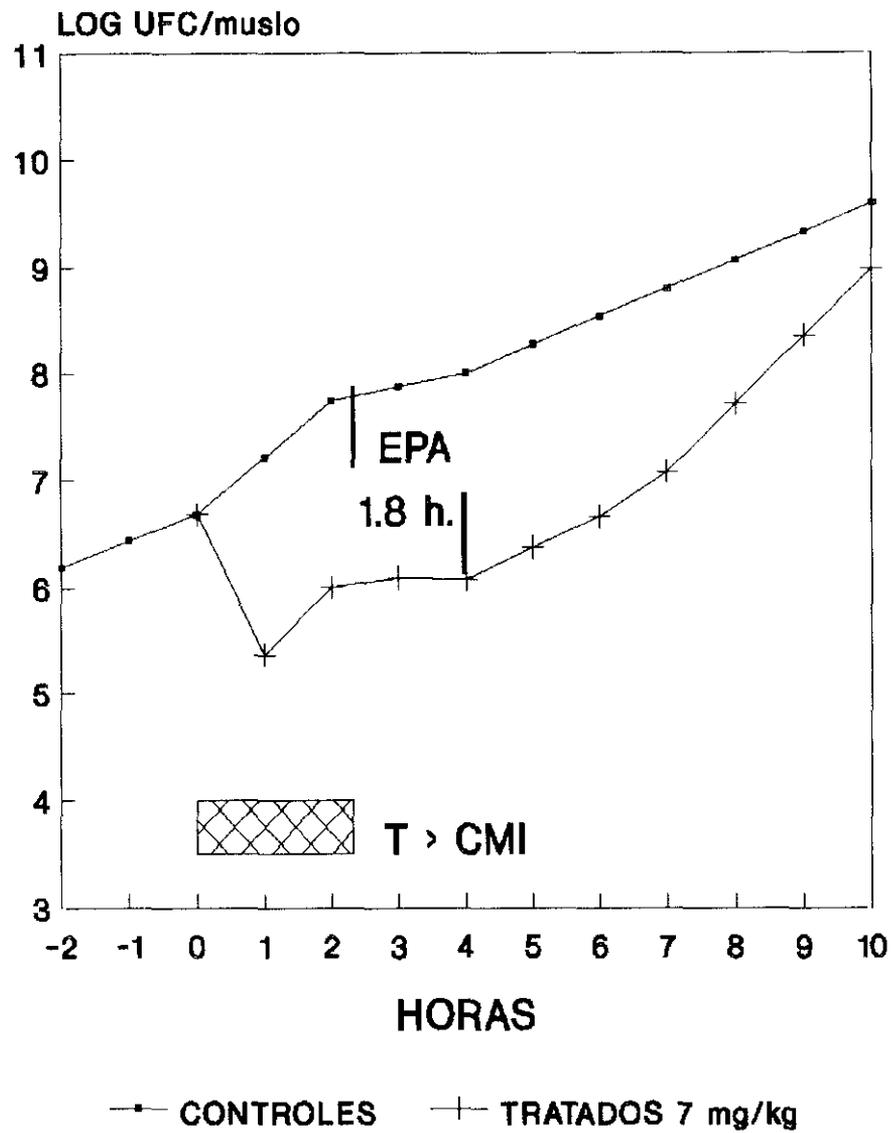


FIG.13 Efecto postantibiótico "in vivo" de fleroxacino frente a *S.aureus*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

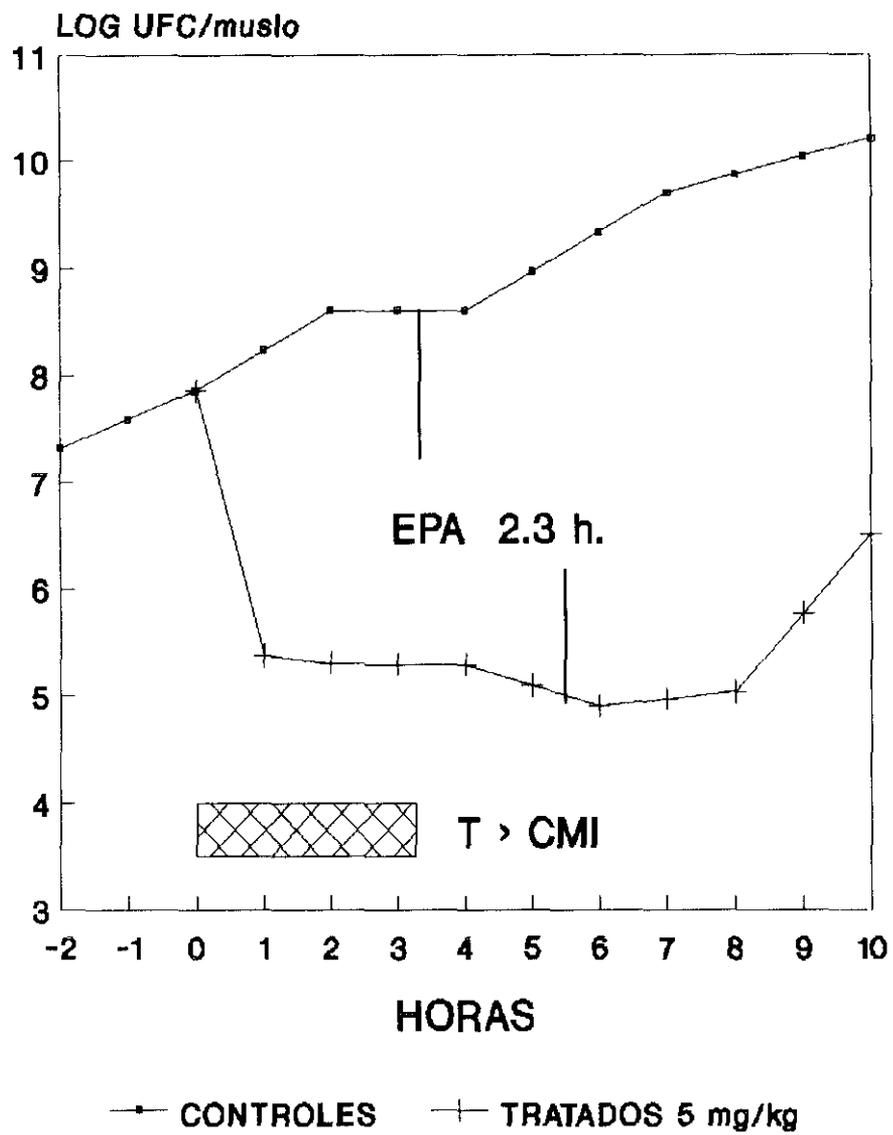


FIG.14 Efecto postantibiótico "in vivo" de fleroxacino frente a *E.coli*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

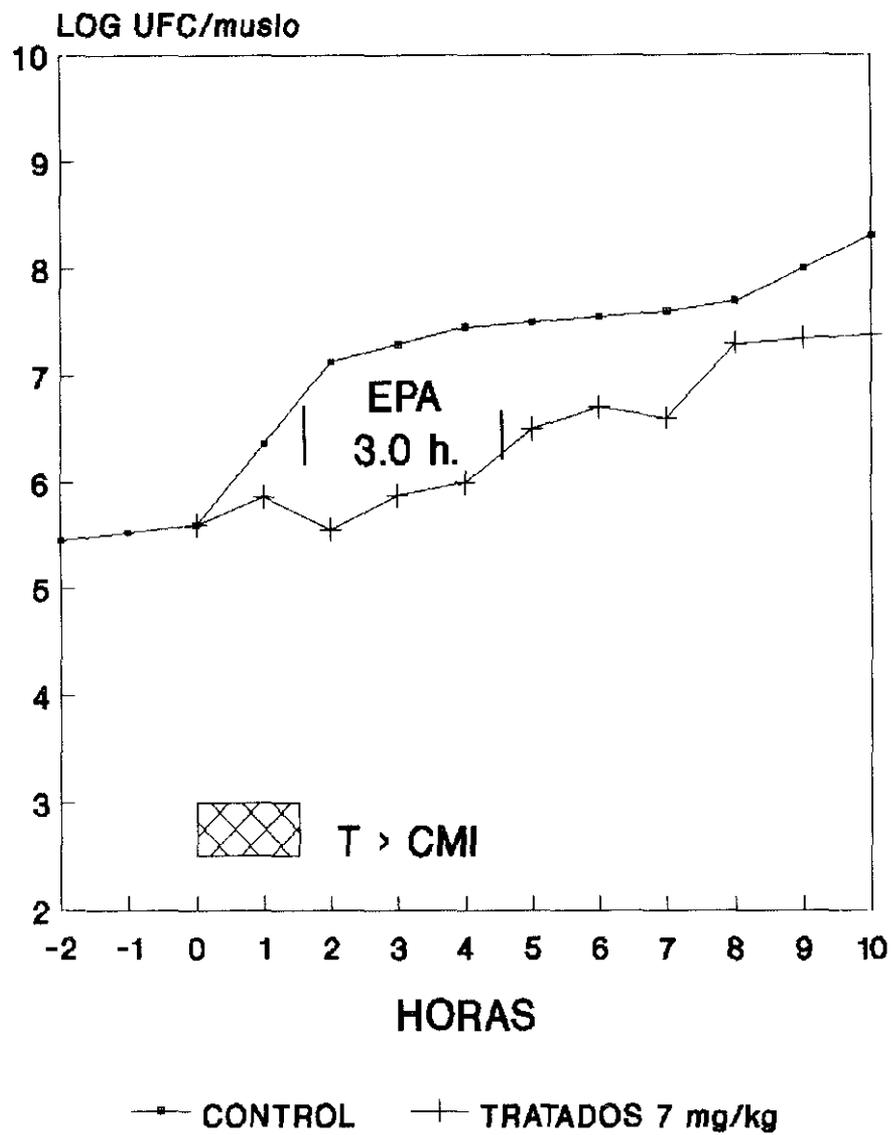


FIG.15 Efecto postantibiótico "in vivo" de lomefloxacino frente a *S.aureus*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

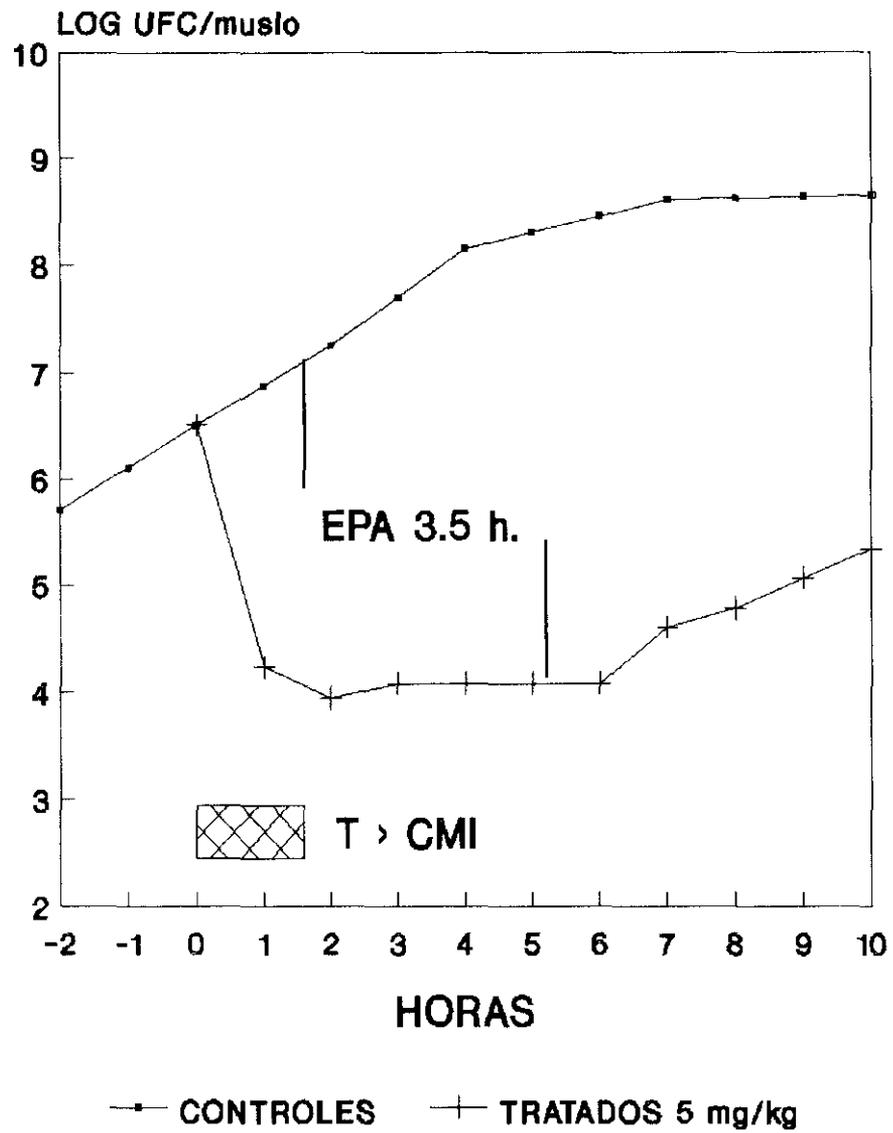


FIG.16 Efecto postantibiótico "in vivo" de lomefloxacino frente a *E.coli*. La barra horizontal indica el tiempo que el antimicrobiano está por encima de la CMI.

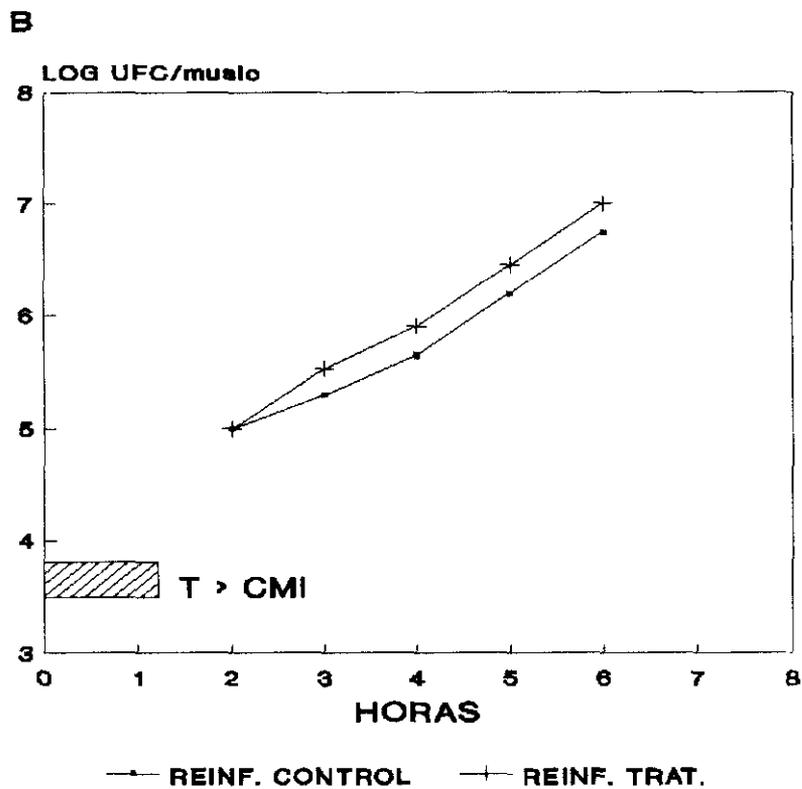
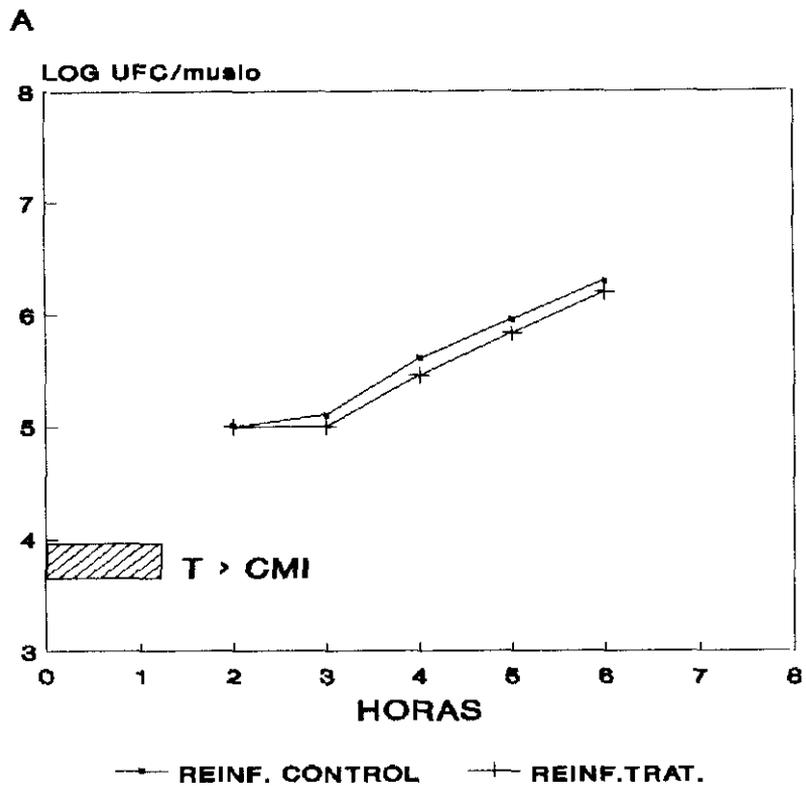


FIG.17

Curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" de gentamicina frente a los microorganismos estudiados (A: S.aureus, B: E. coli).

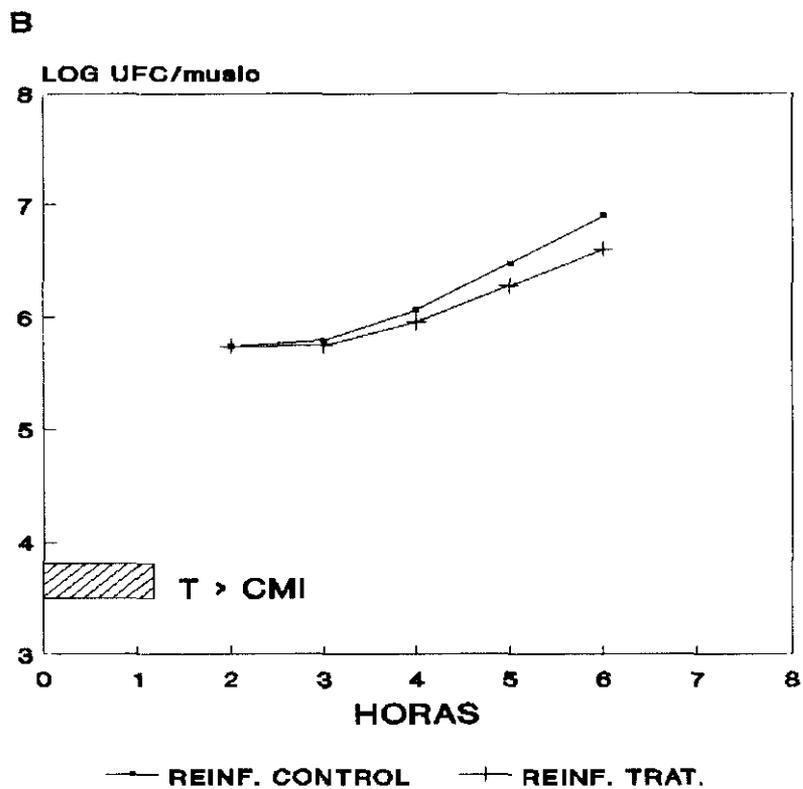
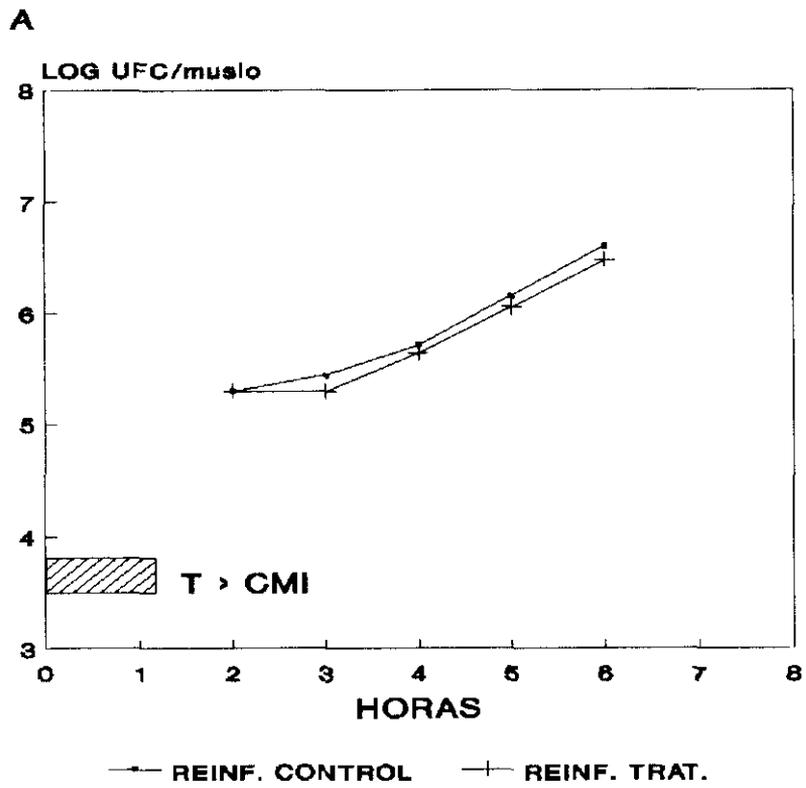


FIG.18

Curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" de netilmicina frente a los microorganismos estudiados (A: S.aureus, B: E. coli).

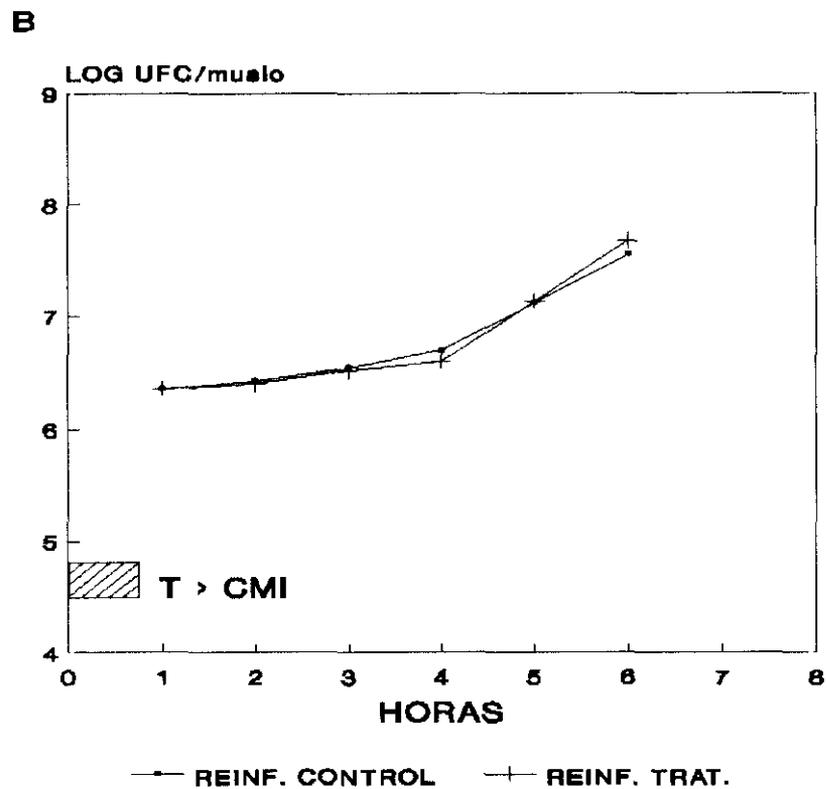
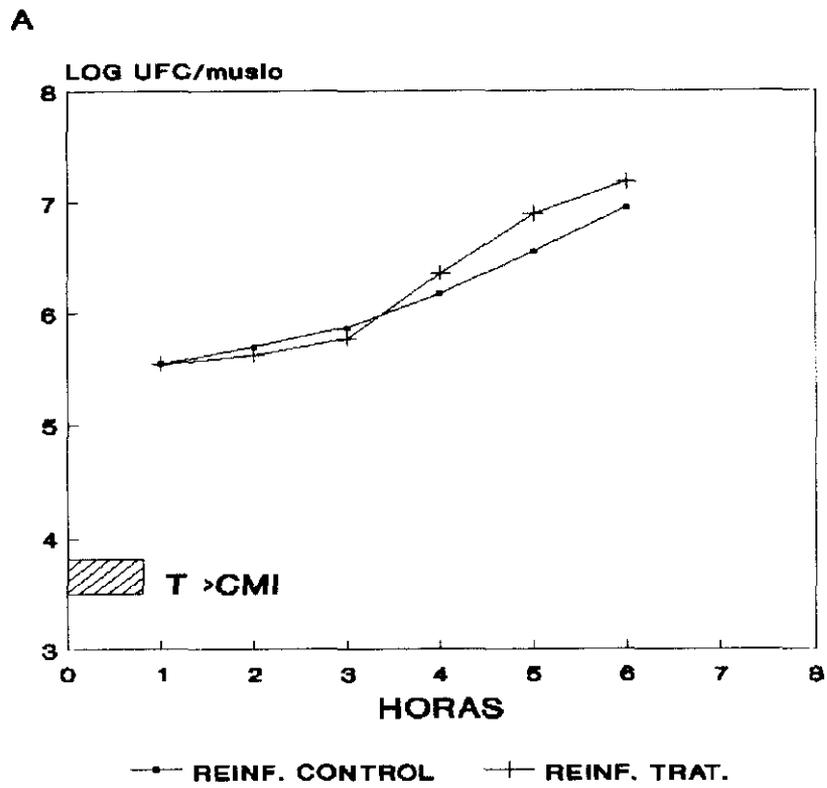


FIG.19 *Curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" de isepamicina frente a los microorganismos estudiados (A: S.aureus, B: E. coli).*

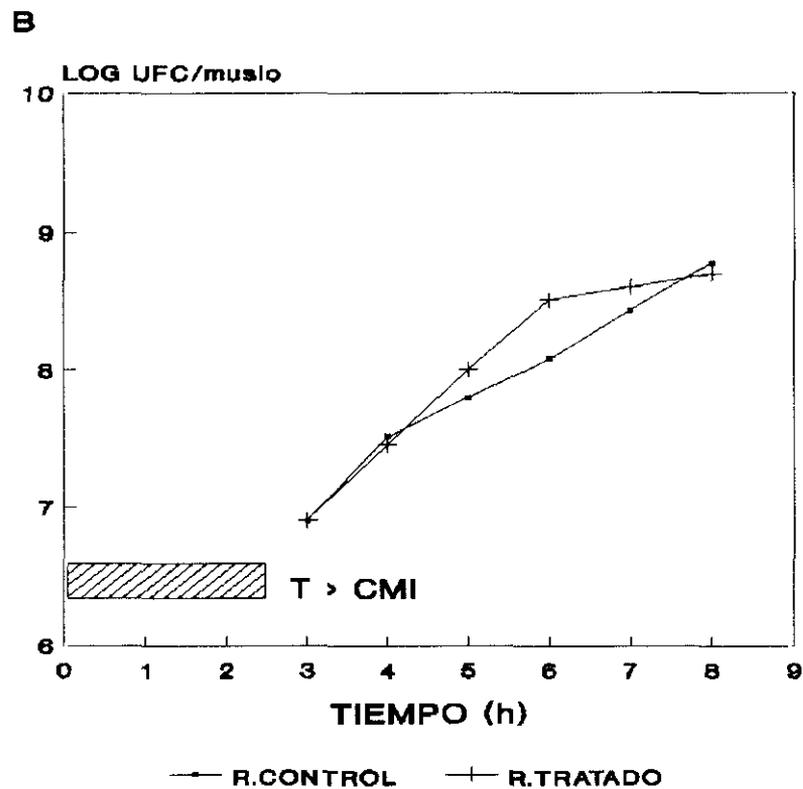
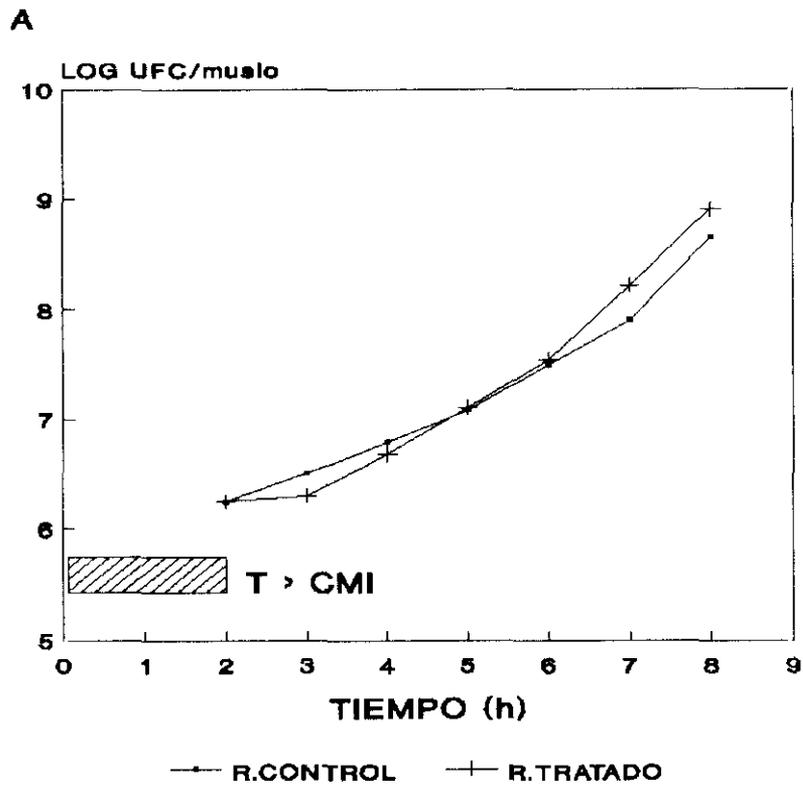


FIG.20

Curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" de ciprofloxacino frente a los microorganismos estudiados (A: S.aureus, B: E. coli).

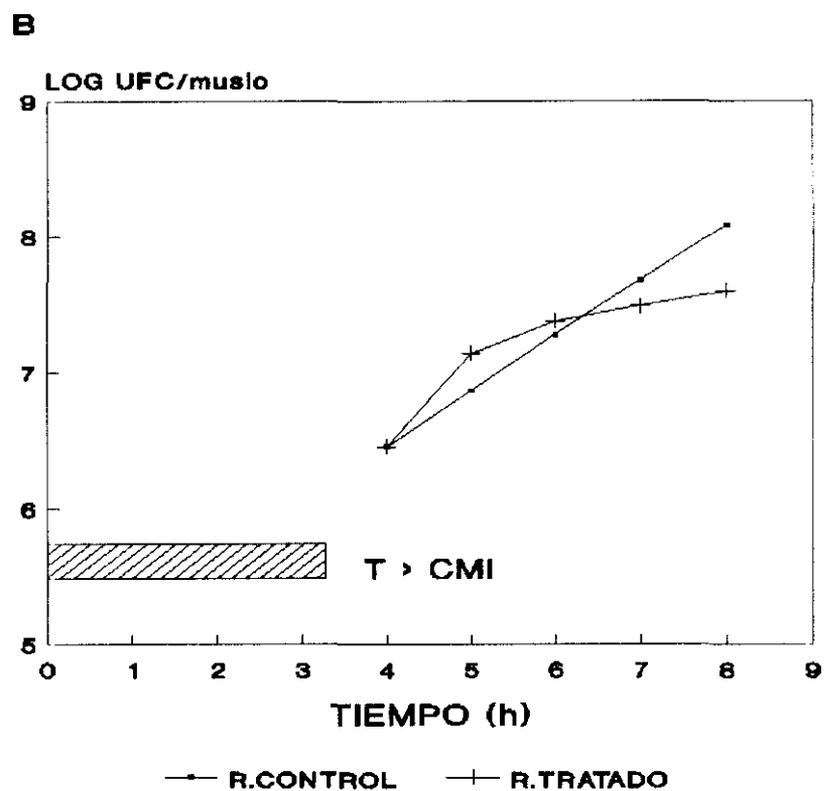
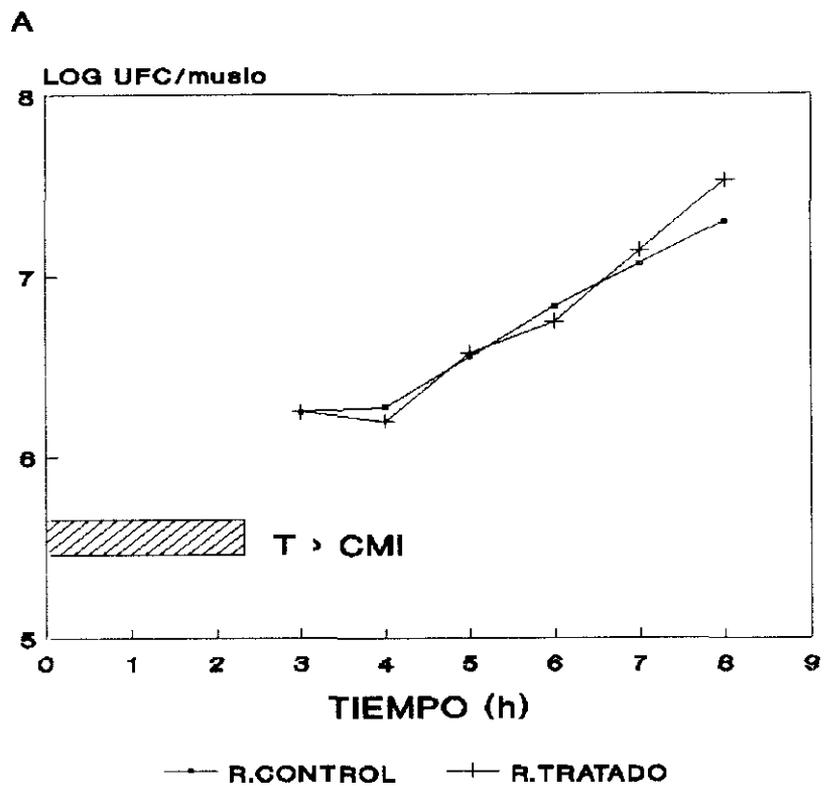


FIG.21

Curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" de fleroxacino frente a los microorganismos estudiados (A: S.aureus, B: E. coli).

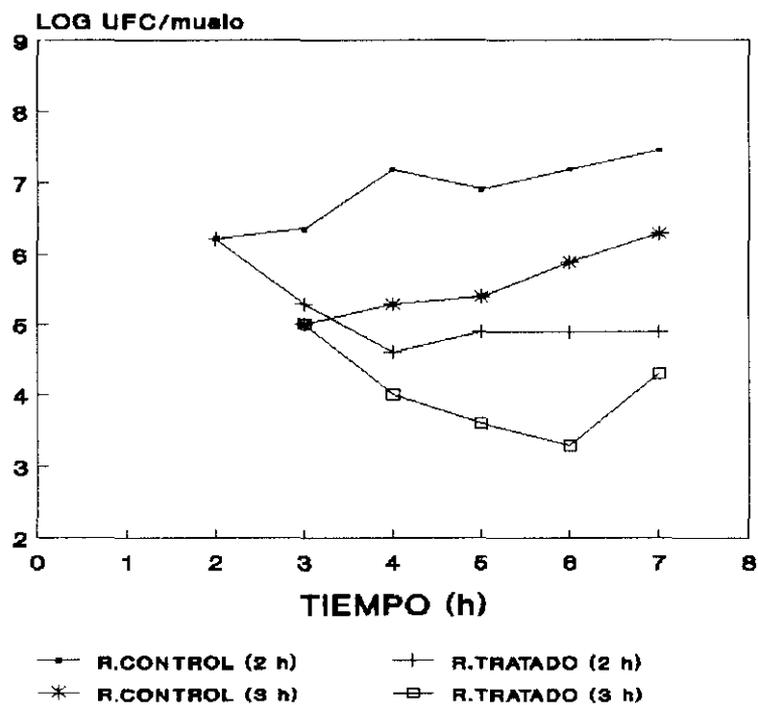
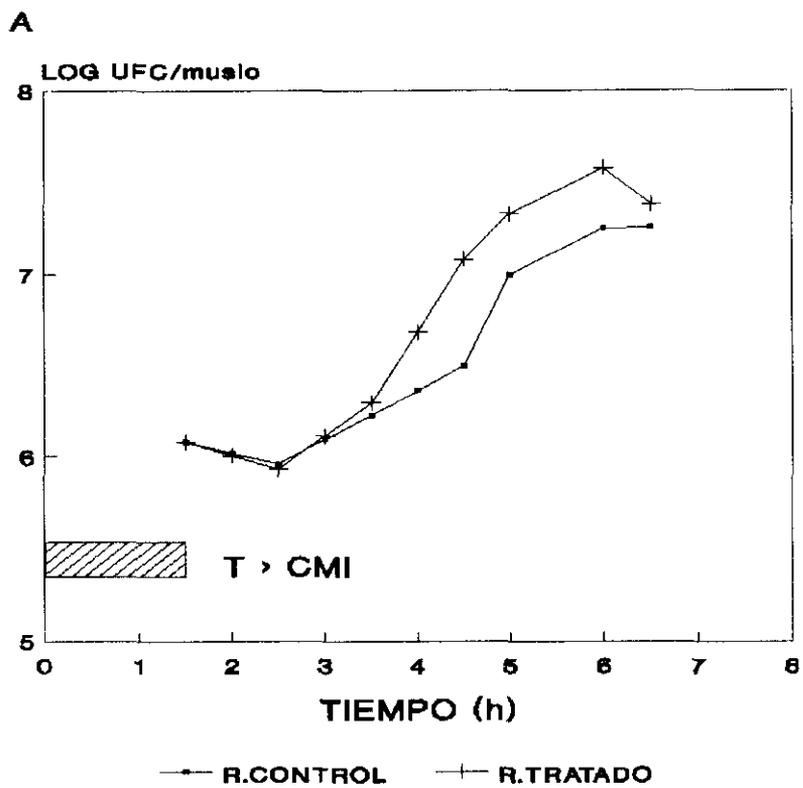


FIG.22

Curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" de lomefloxacino frente a los microorganismos estudiados (A: S. aureus, B: E. coli).

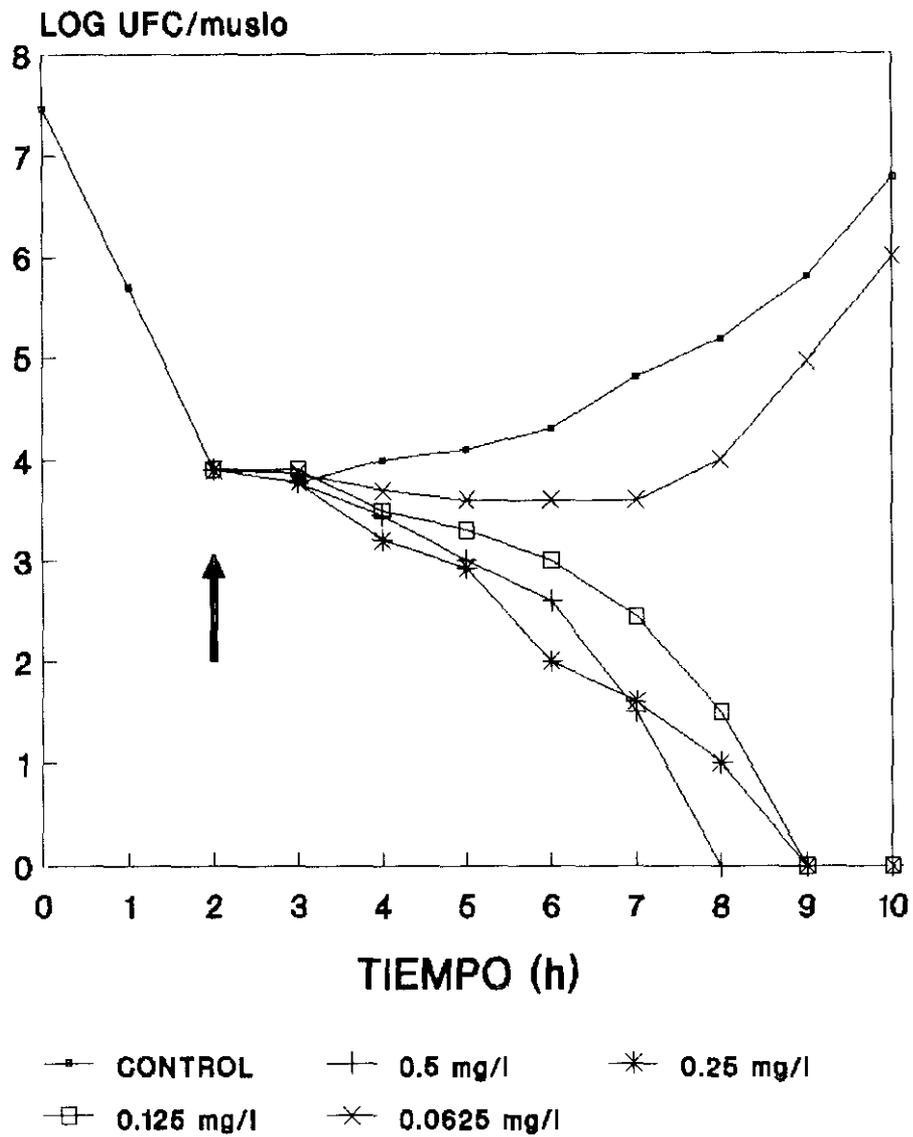


FIG. 23 Efecto de la CMI y concentraciones subinhibitorias de lomefloxacino sobre el crecimiento "in vitro" de *E.coli* en fase de EPA. La flecha señala el comienzo del EPA, tras un tratamiento con 5 mg/l de lomefloxacino.

VII. DISCUSSION

La discusión de los resultados estará centrada principalmente en el EPA, señalando también los aspectos más relevantes del resto de los resultados (sobre todo en fluorquinolonas "in vivo") que puedan influir en el evaluación final del efecto postantibiótico. Así mismo se comentarán algunos puntos de interés en la metodología del EPA, y un análisis comparativo de resultados "in vitro" e "in vivo" en el que se intentará dar una idea de conjunto de este fenómeno y sus aplicaciones prácticas en la terapia antimicrobiana humana.

1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS "IN VITRO"

Los EPA "in vitro" inducidos por aminoglicósidos y fluorquinolonas sobre E.coli y S.aureus han resultado uniformes y amplios, con una media de aproximadamente 2 horas, no encontrándose diferencias significativas ($P = 0.9$) entre ellos (tabla 5). Por lo tanto estos resultados parecen señalar que los EPA "in vitro" para estos antimicrobianos y microorganismos se podrían considerar dentro de un parecido rango y, probablemente este hecho pueda extenderse a otros antibióticos similares.

A continuación se discutirán algunos puntos de interés particular para los antimicrobianos estudiados y una comparación de resultados con otros autores.

1.1. EVALUACION DEL EPA "IN VITRO" DE LOS AMINOGLICOSIDOS

Los aminoglicósidos estudiados mostraron unos EPA homogéneos y moderadamente largos para E.coli y S.aureus que oscila entre 1.2 y 2.4 horas. Las

diferencias observadas individualmente bien pueden ser debidas a las dosis utilizadas o al antimicrobiano.

Isepamicina demostró tener un rápido y fuerte efecto bactericida en previos estudios "in vitro" y, por ello, hubo que disminuir la proporción concentración/CMI en la exposición al microorganismo, escogiéndose una dosis de 3.5 veces la CMI. Esto permitió la evaluación del EPA sin riesgo a perder los microorganismos durante el experimento (201). En el resto de los antimicrobianos se optó por una concentración de 8 veces la CMI para producir un máximo EPA y una hora de exposición para todos ellos (42), incluyendo isepamicina.

Aunque el mecanismo de acción es el mismo en los tres aminoglicósidos y el EPA supondría el resultado de un acoplamiento irreversible del antimicrobiano a los ribosomas bacterianos (47, 138, 155, 168), es evidente la diferente sensibilidad entre gentamicina y netilmicina respecto a isepamicina, siendo mayor en los dos primeros. Sin embargo este hecho no parece influir en su poder bactericida, ya que isepamicina posee las CMI más altas (2 mg/l) pero su efecto bactericida es más elevado (160, 190).

1.2. EVALUACION DEL EPA "IN VITRO" DE LAS FLUORQUINOLONAS

El efecto postantibiótico en fluorquinolonas mostró valores parecidos a los de los aminoglicósidos, situados entre 1.4 y 2.1 mg/l y, al igual que ellos, las diferencias entre uno y otro pueden ser atribuibles al antimicrobiano y su concentración.

En general, un incremento de la concentración y del tiempo de exposición se

acompaña de un incremento en el EPA (2, 37). Sin embargo varios autores (43, 206) han señalado, que un aumento por encima de 10 veces la CMI no implica un aumento significativo del EPA. En el caso de las fluorquinolonas una concentración de 6 mg/l y una hora de exposición resultó apropiada, excepto para ciprofloxacino que por su gran efecto bactericida se disminuyó a 0.5 mg/l, la misma dosis utilizada en el estudio del EPA "in vivo".

El mecanismo exacto de las fluorquinolonas para producir el EPA es todavía desconocido aunque la mayoría de los autores opina que este efecto sería principalmente bacteriostático como consecuencia de los daños subletales y la persistencia en el sitio de acción a nivel de la ADN-girasa (4, 64, 182, 201).

Los más amplios EPA fueron para ciprofloxacino (2 y 2.1 h para S.aureus y E.coli, respectivamente) explicados quizá por su buena actividad bactericida y la mayor sensibilidad de los microorganismos, sobre todo E.coli; a ello se une que este antimicrobiano actúa tanto en fase logarítmica como exponencial (46, 186).

1.3. COMPARACION CON OTROS AUTORES

La duración del EPA "in vitro" entra dentro de los intervalos observados por otros autores para antimicrobianos de la misma familia, aunque las concentraciones ensayadas por ellos varían (tabla 6) y el tiempo de exposición oscila entre 1 y 2 horas.

TABLA 6 - Resultados de EPA "in vitro" evaluados por otros autores con algunos de los antimicrobianos estudiados y otros de la misma familia.

ANTIMICROBIANO	MICROORGANISMO	CMI (mg/l)	CONCENTRACION (mg/l)	EPA (Horas)
<i>Gentamicina</i>	<i>E. coli</i> (43)	0.5	2	1.8
	<i>E. coli</i> (100)	0.5	4	4.7
	<i>S. aureus</i> (43)	1	5	0.3
<i>Amikacina</i>	<i>S. aureus</i> (163)	2	20	2.2
	<i>E. coli</i> (163)	1	10	1.9
<i>Tobramicina</i>	<i>E. coli</i> (43)	1	4	1.2
	<i>E. coli</i> (164)	1	2	1.2
			6	1.8
<i>Netilmicina</i>	<i>E. coli</i> (100)	0.5	4	6.1
<i>Ciprofloxacino</i>	<i>S. aureus</i> (43)	0.1	0.5	2
	<i>S. aureus</i> (136)	0.5	1.5	2.1
	<i>E. coli</i> (164)	0.015	0.03	1.2
			0.09	2.5
<i>E. coli</i> (43)	0.007	0.03	2.1	
<i>Norfloxacino</i>	<i>S. aureus</i> (42)	0.2	1	2.4
	<i>S. aureus</i> (163)	1	10	2.9
	<i>E. coli</i> (163)	0.062	0.62	1.9
	<i>E. coli</i> (43)	0.48	0.24	2.2

Craig y cols. (43) evaluaron el EPA mediante el método de recuento en placa, así como Renneberg y Walder (163). Rescott y cols. (164) emplearon dos métodos para evaluar el EPA "in vitro"; uno de ellos, el más utilizado, de recuento en placa de agar y el otro, un método espectrofotométrico, no encontrando ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Esto mismo ha sido confirmado recientemente por Meng y cols. (136) quienes afirman que ambos métodos son comparables en sus resultados. Isaksson y cols. (100) han determinado el EPA por el método de bioluminiscencia de ATP bacteriano y es muy probable que esté supervalorado como ya se comentó en el apartado de introducción. El EPA de ciprofloxacino frente a S.aureus también ha sido estudiado por Fuursted (67, 68) y los resultados están en el mismo rango de los aquí encontrados.

En general habría posibilidad de afirmar, observando los datos, que el efecto postantibiótico "in vitro" de aminoglicósidos y fluorquinolonas frente a E.coli y S.aureus tiene una media de 2 horas de duración, con variaciones individuales según la técnica, concentración empleada o el tipo de microorganismo (43, 201, 203, 217).

2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS "IN VIVO"

El modelo de infección en muslo de ratón neutropénico ha resultado ser un modelo idóneo y relativamente rápido y sencillo en la evaluación del EPA como se verá más adelante.

En cuanto a los resultados del EPA "in vivo" en nuestras condiciones experimentales, no se han encontrado diferencias significativas debidas a un microorganismo u otro ($P = 0.9$), pero en cambio sí la hay según la familia de antimicrobiano. Los EPA de aminoglicósidos fueron significativamente mayores que

los de fluorquinolonas ($P = 0.005$) oscilando los primeros entre 3.1-5.1 h. y 1.8-3.5 h. los segundos; así en el modelo experimental "in vivo" parece que influye más la clase de antimicrobiano que el tipo de microorganismo.

Otros puntos interesantes del EPA "in vivo" que también hay que considerar son la farmacocinética y propiedades del antimicrobiano, que "in vitro" no era necesario tener en cuenta.

2.1. EVALUACION DEL EPA "IN VIVO" DE LOS AMINOGLICOSIDOS

El EPA observado en aminoglicósidos ha sido amplio para los dos microorganismos, de aproximadamente 4 horas como media, con una dosis que no excedió de 8 veces la CMI y un tiempo de exposición de alrededor de una hora. Al igual que "in vitro" los resultados se muestran homogéneos en cuanto a dosis, tiempo en que las concentraciones del antimicrobiano son mayores a la CMI (la vida media y propiedades farmacocinéticas son relativamente parecidas), e incluso efecto bactericida, lo que facilitaría las comparaciones y generalizaciones con otros autores y aminoglicósidos.

Isepamicina mostró los mayores EPA, aunque la dosis empleada fué menor, debido a su mejor actividad como ya se comentó antes en el aparatado anterior.

Todos los EPA son verdaderos puesto que no se encontró actividad alguna de subCMI en las reinfecciones (figuras 17, 18 y 19). Este punto podría ser puesto en duda (ver discusión de EPA en fluorquinolonas) debido a que las infecciones han sido producidas por microorganismos en fase logarítmica de crecimiento y aún no ha sido comprobado, en el caso de los aminoglicósidos y con este modelo animal,

si existe actividad de esos niveles de concentración subinhibitoria con bacterias en fase de EPA. Es decir, el EPA podría cubrir una parte del período durante el cual los niveles fueron subCMI, evitando así la recuperación precoz del crecimiento (77). Renneberg (163) en su modelo de hilos de algodón utiliza unos experimentos control más completos que Vogelmann, y comprueba "in vivo" con amikacina frente a S.aureus y P.aeruginosa en fase de EPA y logarítmica lo dicho anteriormente, no encontrando ningún grado de actividad de las subCMI.

La mayor o menor duración del EPA no parece depender de la CMI directamente (a menos que sean muy extremas), sino del mecanismo de acción intrínseco de cada antimicrobiano y, sobre todo, de las concentraciones en suero. De hecho, en la bibliografía se encuentra que el log ABC (logaritmo del área bajo la curva de concentración de antimicrobiano en el tiempo) es el parámetro que más influye en el éxito terapéutico de los aminoglicósidos (42, 46, 202). Por tanto, es de esperar que dosis mayores, que provoquen un pico grande de concentración y aumenten el efecto bactericida, prolongándose así mismo las concentraciones en suero en el tiempo, produzcan un EPA más largo.

2.2. EVALUACION DEL EPA "IN VIVO" DE LAS FLUORQUINOLONAS

Aunque menores que los de aminoglicósidos, los EPA de las fluorquinolonas también fueron importantes, con un rango entre 1.8 y 3.5 horas, y algo mayores sobre E.coli posiblemente por su mayor sensibilidad.

Las dosis hubo que adaptarlas según la quinolona, su actividad y CMI. En un principio se intentó unificar las dosis a 7 mg/kg, pero se bajó un poco para ciprofloxacino frente a S.aureus (4 mg/kg) por temor a "perder" los

microorganismos debido a una actividad bactericida potente y rápida; por el mismo motivo hubo que disminuirla bastante frente a E.coli (0.5 mg/kg). En previos estudios se encontró un fuerte efecto bactericida "in vivo" de las fluorquinolonas frente a E.coli y se optó por reducir la dosificación a 5 mg/kg.

En las fluorquinolonas se encontraron mayores valores de tiempo sobre la CMI y mayores reducciones en el crecimiento, que en aminoglicósidos, pero sin embargo los EPA mostrados por esta familia fueron sensiblemente menores. Una explicación para este menor EPA y mayor efecto inhibitorio puede ser el probable cambio en la morfología de los microorganismos en su exposición a la fluorquinolona (120, 121). El recuento de UFC estaría subestimado durante el espacio de tiempo de la exposición al antibiótico; pero en cuanto el antimicrobiano desapareciera los microorganismos revertirían a su forma normal, y el ratio de crecimiento en tratados aumentaría bruscamente superando incluso al de los controles. Este hecho se observa mejor en las gráficas del EPA de fluorquinolonas frente a S.aureus (figuras 11, 13 y 15) posiblemente debido a que el efecto bactericida es menor y la curva de microorganismos tratados se recupera antes. Esto sugiere que el EPA está influido por la actividad bactericida y bacteriostática del antimicrobiano en el tiempo, y depende de la sensibilidad particular de cada microorganismo al mecanismo de acción de éste.

Dicho de otra forma, el EPA en fluorquinolonas se presentaría según el grado de acción bacteriostática (que coincide con el período de cambio de morfología) y el tiempo en que tardan en recuperarse los microorganismos tratados (influido por el efecto bactericida). Cuanto mayores sean estas dos acciones, más tiempo tardarán los microorganismos en recuperar una cinética normal de crecimiento y mayor será el EPA. Incluso si se consigue una actividad bactericida elevada, el cultivo tardará más tiempo en recuperarse y en la aplicación clínica del EPA se podría conseguir la erradicación de los microorganismos a intervalos de dosificación largos con dosis grandes.

2.2.1. Valoraciones farmacocinéticas y farmacodinámicas que influyen en el EPA

Las diferencias encontradas en el tiempo que se mantiene el antimicrobiano sobre la CMI se deben probablemente a las propiedades farmacocinéticas de los antibióticos. Fleroxacino mostró los mayores valores (2.2 h y 3.2 h frente a S.aureus y E.coli, respectivamente) ya que posee la mayor vida media y ABC junto con una buena penetración en tejidos y fluidos (143, 210). Lomefloxacino a pesar de tener buenas propiedades, tiene una eliminación renal muy elevada (210), a ello se une una menor dosis en relación a la CMI (algo elevadas en comparación con el resto) y esto explica quizá que tenga los valores más bajos de concentración sobre la CMI en suero.

2.2.2. Control de las concentraciones subinhibitorias en el EPA "in vivo"

Teniendo lo anteriormente en cuenta, sorprende que los mayores tiempos de EPA sean los de lomefloxacino, sobre todo frente a S.aureus que tiene CMI moderadamente alta y tiempo sobre la CMI y efecto bactericida relativamente bajos. Es posible que sea debido a la mayor afinidad de la fluorquinolona por la ADN-girasa de este microorganismo y su mayor persistencia en el sitio de acción de éste (157).

Sin embargo en el caso de E.coli fué demostrada una fuerte actividad subinhibitoria, incluso al cabo de 3 horas de la administración del antimicrobiano (figura 22 B). Por medio de reinfecciones con microorganismos en fase logarítmica, en un tiempo en el que se suponía que el antimicrobiano no tendría efecto

bactericida, pudo comprobarse que el EPA estaba valorado muy por encima de lo que debería ser en realidad. Se descartó la acumulación intracelular ya que las fluorquinolonas y aminoglicósidos, aunque tienen cierta acumulación en fagocitos y fibroblastos, no hay discrepancia, en experimentos de pocas horas, con la disponibilidad clínica del antimicrobiano (196). Se realizó un experimento complementario "in vitro" con microorganismos en fase de EPA (figura 23), y pudo comprobarse que el efecto bactericida aumentaba sensiblemente de tal forma que, en cultivos con $1/2$ y $1/4$ * CMI no había crecimiento en 6-7 h.

A la vista de esto cabe dudar acerca del papel de las reinfecciones de control de la actividad subinhibitoria "in vivo" con microorganismos en fase exponencial de crecimiento. Estos experimentos parece que detectarían actividad de las subCMI cuando ésta es grande (caso de lomefloxacino) pero esa actividad que actúa sobre bacterias en fase de EPA, que es lo que realmente ocurre, es posible que pase desapercibida (figuras 17 a 22 A).

Hay motivos para pensar que en las fluorquinolonas y otros antibióticos (en el apartado 2.1 de aminoglicósidos ya se comentó esta posibilidad) puede ocurrir este efecto debido a las concentraciones de subCMI. En el caso de los betalactámicos se han encontrado tiempos de EPA debidos o influidos por concentraciones subinhibitorias (133, 149, 151, 173, 212). En las fluorquinolonas aún no hay casi referencias pero, Aoyama y cols. (4) observan actividad bactericida y bacteriostática de ciprofloxacino y fleroxacino frente a S.aureus con un $1/2$ y $1/4$ veces la CMI, y frente a E.coli con un $1/2$ * CMI. Si esta actividad se manifiesta con bacterias en fase de crecimiento logarítmico es muy probable que, cuando estén en fase de EPA, el efecto bactericida aumente de tal forma que el cultivo tarde mucho más tiempo en recuperarse (figura 16). Dalhoff y Ullman (46) encuentran que las quinolonas a concentraciones mayores de la CMI afectan a la membrana interna bacteriana, y presentan la posibilidad de que el EPA esté mediatizado por subCMI.

Recientemente, Shibata y cols. (183) teniendo en cuenta la actividad de las subCMI "in vivo" con diversas fluorquinolonas en el estudio del EPA, observan que el tiempo que tardan en alcanzar tasas de crecimiento normal los microorganismos tratados es muy alto en comparación con lo que ocurre "in vitro". Esto es debido precisamente a la larga vida media y permanencia en los tejidos de este tipo de antimicrobianos.

2.3. COMPARACION CON OTROS AUTORES

Encontrar un modelo con las mismas concentraciones de antimicrobiano, técnicas empleadas y cepas utilizadas es muy difícil, mayormente por la poca disponibilidad de datos "in vivo" ya que estos modelos animales son relativamente modernos y aún no están bien estandarizados. A pesar de estas limitaciones, la comparación con otros autores (tabla 7) siempre puede orientar y permitir una evaluación más global de este fenómeno.

De la bibliografía señalada en la tabla Vogelmann y cols. (42, 43, 203) utilizan el modelo de infección en muslo de ratón neutropénico y una técnica muy similar a la de este trabajo. Renneberg (163) utiliza un modelo de hilos de algodón en ratones normales, bien estandarizado y con un control más riguroso que Vogelmann de las concentraciones subinhibitorias que garantiza que los tiempos de EPA encontrados sean auténticos.

Los EPA de aminoglicósidos son algo más bajos, sobre todo para E.coli, que los obtenidos en este estudio, pero se podría decir que en conjunto no difieren mucho, ya que los valores de EPA varían de un trabajo a otro tanto "in vitro" como "in vivo". Por ello, el efecto postantibiótico de una determinada combinación

antimicrobiano-microorganismo, dos factores importantes que afectan a la duración del EPA (203), ha de ser evaluado dentro de un determinado rango de valores más o menos amplio (42). Por ejemplo, Fantin y Craig (63) encontraron rangos de EPA "in vivo" de 1.4 a 6.9 horas con gentamicina frente a 15 aislados clínicos de enterobacterias.

TABLA 7 - Resultados de EPA "in vivo" evaluados por otros autores con algunos de los antimicrobianos estudiados y otros de la misma familia.

ANTIMICROBIANO	MICROORGANISMO	CMI (mg/l)	DOSIS (mg/l)	EPA (Horas)
Gentamicina	<u>S. aureus</u> (203)	0.5	4	3.4
	<u>E. coli</u> (203)	0.5	6	1.7
Amikacina	<u>S. aureus</u> (163)	2	10	2.3
	<u>E. coli</u> (163)	1	10	3.8
Tobramicina	<u>E. coli</u> (203)	0.7	8	1.8
Netilmicina	<u>E. coli</u> (42)	0.5	3	1.7
Ciprofloxacino	<u>E. coli</u> (43)	-	3.12	3.8
Norfloxacino	<u>S. aureus</u> (163)	1	3	4.3
	<u>E. coli</u> (163)	0.062	3	3.4

En quinolonas los valores son más similares a los aquí obtenidos y, aunque son pocos los datos de modelos "in vivo", parece que el EPA de las fluorquinolonas está en consonancia con los encontrados en este estudio.

3. EVALUACION TOTAL DEL EPA "IN VITRO" E "IN VIVO"

Teniendo en cuenta todos los resultados se elaboró un análisis estadístico de la varianza, entre diferentes grupos de muestras, para obtener algunos datos globales del EPA que permitan extraer conclusiones más claras (tabla 5).

Los tiempos totales de EPA obtenidos en el modelo experimental "in vivo" claramente superan a los encontrados "in vitro" ($P = 0.0001$), tanto en lo referente a los aminoglicósidos ($P = 0.0001$) y fluorquinolonas ($P = 0.03$) como a los microorganismos, S.aureus ($P = 0.02$) y E.coli ($P = 0.001$). Este hecho corrobora los resultados obtenidos por la mayoría de los investigadores (29, 43, 163, 203). La explicación más probable sería que ambas familias de antimicrobianos son muy bactericidas y elevadas concentraciones de antibiótico "in vitro" provocarían un gran número de muertes bacterianas, por lo que la evaluación del EPA por recuento de bacterias viables sería difícil (42, 201). En cambio "in vivo" la concentración es fluctuante, con una exposición generalmente más larga y suave que permite que la muerte de los microorganismos no sea tan brusca y pueda evaluarse mejor (203). A pesar de esto, los datos del EPA in vivo utilizando el modelo de infección en muslo de ratón neutropénico son concordantes con los encontrados "in vitro" (43). Otros investigadores han obtenido parecidos resultados con este modelo y antimicrobianos como isepamicina y nuevas quinolonas (141, 152).

No se encontró diferencia significativa en el conjunto de los EPA debidas a

los microorganismos S.aureus y E.coli ($P = 0.9$), ni para los antimicrobianos ($P = 0.8$) aunque como ya se vió anteriormente la diferencia entre aminoglicósidos y fluorquinolonas sí se manifiesta "in vivo". De esta forma parece que el modelo animal además de adecuarse más a los EPA reales (más largos y complejos) permitiría cuantificarlos y discernirlos con más claridad entre una familia y otra de antimicrobiano.

En cuanto a la igualdad de EPA en los dos microorganismos S.aureus y E.coli, en la bibliografía se observa que con antimicrobianos betalactámicos los EPA de Gram-positivos resultan bastante más grandes que los de Gram-negativos, no encontrándose en los segundos supresión significativa del crecimiento bacteriano o incluso EPA negativo (43). Una excepción sería imipenem, ya que se ha observado EPA sobre los dos tipos de microorganismos (6). Respecto a otros antibióticos (aminoglicósidos, fluorquinolonas, macrólidos) esta diferencia no es tan evidente (42, 163), no encontrándose ningún caso en que se haya realizado un análisis estadístico con un gran número de muestras para demostrar lo contrario.

A la vista de los resultados, el efecto postantibiótico en aminoglicósidos y fluorquinolonas se podría resumir en la tabla 8.

TABLA 8 - Resultados de EPA obtenidos en este trabajo con aminoglicósidos y fluorquinolonas frente a S.aureus y E.coli.

ANTIMICROBIANOS	EPA "IN VITRO" (h)	EPA "IN VIVO" (h)
AMINOGLICOSIDOS	1.2 - 2.4	3.1 - 5.1
FLUORQUINOLONAS		1.8 - 3.5

4. EVALUACION DEL MODELO EXPERIMENTAL

4.1. MODELO "IN VITRO"

La elección de la técnica de dilución para eliminar el antimicrobiano se hizo principalmente en base a su facilidad y rapidez. Por otra parte la mayoría de los autores prefieren también esta técnica con lo que la comparación de datos sería más aproximada (29, 43, 68, 112, 132, 133, 163, 164). El mayor inconveniente es la posibilidad de perder el cultivo tratado con antimicrobianos muy bactericidas después de efectuar la dilución (generalmente 1:1000). A pesar de estas limitaciones, tomando precauciones en escoger la concentración y el tiempo de exposición adecuados para cada antimicrobiano este método resulta sin lugar a dudas el más cómodo y rápido.

La utilización de los microorganismos E.coli y S.aureus se hizo teniendo en cuenta varios factores; primero, las relativamente altas frecuencias en enfermedades infecciosas como patógenos principales o como asociados; segundo, como representantes de dos clases diferentes de microorganismos (Gram-positivos y Gram-negativos) con características diferentes en cuanto al EPA; y tercero, la mejor comparación con los datos de otros autores, ya que son los microorganismos más utilizados. Hay otros factores que influyen en esta elección como los bajos requerimientos nutricionales que necesitan para obtener un buen crecimiento, su fácil identificación y comodidad de manejo.

Los microorganismos se utilizaron en fase de crecimiento exponencial para poder evaluar el crecimiento microbiano en pocas horas, y porque además la mayoría de los estudios en la bibliografía los realizan en esta fase. Por otra parte,

nos encontramos con una mejor aproximación a la realidad de una infección aguda "in vivo" que debe ser tratada con antimicrobianos y, aunque el tamaño inóculo sea mayor, en la mayoría de los antimicrobianos este hecho no influye básicamente en el EPA. En bacilos Gram-negativos parece que se ha encontrado una disminución del EPA al aumentar el tamaño inóculo, pero todavía queda mucho por investigar ya que los datos son escasos, algo contradictorios, y en modelos "in vivo" como el de hilos de algodón o infección en muslo aún no se ha estudiado (56, 89, 164). Hay que señalar que algunos antimicrobianos actúan en fase de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria (74, 186) por lo que este punto puede ser también importante en futuras investigaciones "in vitro".

4.2. MODELO "IN VIVO"

El modelo de infección en muslo de ratones neutropénicos se clasificaría dentro de los llamados modelos monoparamétricos (178, 216) en los cuales se mide un indicador simple de la efectividad del antimicrobiano, en este caso el EPA. Las posibilidades de este modelo son grandes y podría dar lugar a un modelo multiparamétrico en el que se evaluaran diversos aspectos como farmacocinética, EPA, PALE y pequeños tratamientos a corto plazo.

El modelo de infección en muslo de ratón neutropénico posee grandes ventajas frente a otros modelos animales:

- fácil manejo de los animales.
- rapidez y eficacia en la obtención para su recuento de las bacterias del muslo.
- los niveles de antimicrobiano en suero pueden estimar las concentraciones en el líquido intersticial del músculo del muslo.

- la inmunodepresión permite ver aisladamente la relación bacteria-antimicrobiano.
- las curvas de control de las concentraciones subinhibitorias comprueban que el EPA no se debe a la acción del antimicrobiano residual.

Estas ventajas, constatadas por nosotros y otros autores (46, 75, 83, 139, 203), se pueden matizar y discutir para ejemplos concretos encontrados en este trabajo.

La técnica de bioensayo por pocillos utilizada, ha demostrado buena sensibilidad (coeficientes de determinación R^2 en las rectas estándar muy cercano a uno), para detectar las concentraciones fisiológicas de los antimicrobianos en el suero murino hasta la CMI.

Hay muchos factores que intervienen en la penetración y distribución del antimicrobiano en los tejidos (13, 38, 59, 106, 108, 111, 129, 161). Sin embargo, se ha demostrado que modelos animales con una $AS/V \geq 60$ ($AS/V = \text{área de superficie de contacto entre los capilares y el compartimento que se estudia, respecto al volumen de líquido que contiene}$), los niveles de antimicrobiano en suero son muy parecidos a los encontrados en tejidos (172). El modelo de infección en muslo y casi todos los modelos que utilizan compartimentos naturales, tienen una relación AS/V alta. Por tanto, los niveles de antimicrobiano (y sus metabolitos activos) en suero estimarían relativamente bien las concentraciones en el fluido intersticial del músculo del muslo (34, 162, 170, 171, 172, 203). Así mismo se ha comprobado que la farmacocinética es igual en ratones infectados y normales ya que no se origina absceso (debido a la neutropenia) y el edema producido es mínimo (162), no variando entonces la relación AS/V .

Otros factores que influyen son la unión a proteínas en el suero (11, 41, 79), pero la concentración de albúmina en el líquido intersticial es sólo el 50% de la del suero; además esta unión en aminoglicósidos y fluorquinolonas es mínima (19, 79,

185, 209), como ya se señaló en el apartado de introducción, siendo prácticamente despreciable su interferencia en el bioensayo.

El empleo de la ciclofosfamida como inmunodepresor ha demostrado su eficacia ya que generalmente no es tóxico y favorece que se instale la infección. De lo contrario, deberían emplearse inóculos muy altos produciendo sepsis fulminante en el animal.

Las reinfecciones control de la actividad antimicrobiana residual es un punto que debe ser revisado. Como se ha apuntado antes con algunos antimicrobianos (ciprofloxacino, fleroxacino), esta técnica parece no detectar la actividad de las subCMI en bacterias con fase de crecimiento logarítmico, cuando ésta es débil. Sin embargo, la realidad es que las bacterias de la infección se encuentran en fase de EPA y entonces es probable que esa actividad se manifieste. En lomefloxacino se vió actividad de subCMI con los dos tipos de bacterias, pero con otros antimicrobianos este tema ha de ser estudiado más a fondo puesto que el EPA "in vivo" puede estar sobreestimado en algunos casos.

Una solución a este problema sería la propuesta por Shibata y cols. (183) que, para medir el EPA "in vivo", emplea el término de tiempo de "recrecimiento" efectivo (TRE) como el tiempo necesario que necesitan los microorganismos tratados para alcanzar el número de bacterias que había antes del tratamiento. Este parámetro resultaría muy útil para moléculas con actividad subinhibitoria, y además, no se necesita saber el tiempo en que se mantiene el antimicrobiano por encima de la CMI, con lo cual es un ahorro de tiempo y de material.

5. EXTRAPOLACION A LA CLINICA HUMANA DEL EPA Y OTROS FACTORES EN LOS PROTOCOLOS DE DOSIFICACION

Aunque en los modelos animales, y en concreto el de infección en muslo, evidentemente no es posible hacer una extrapolación directa de los resultados, sí ayudan a obtener datos que por razones éticas o técnicas son difíciles de obtener en el hombre (12, 15, 21, 39, 214, 215, 216). Evaluando convenientemente los resultados y teniendo en cuenta sus limitaciones, estos modelos parecen ser la única manera de estudiar determinados efectos, como el EPA "in vivo". Esto no quiere decir que se tenga que prescindir del trabajo "in vitro" sino que, por el contrario, éste nos proporciona un apoyo básico e indispensable en la orientación del experimento animal y en la actividad de un antimicrobiano (213).

La búsqueda de una terapia conveniente (109, 131, 145) no sólo debe basarse en test de susceptibilidad "in vitro", sino que hay otros puntos importantes a tener en cuenta, por ejemplo el EPA, la farmacocinética, posible selección de resistencias, la toxicidad y el efecto PALE, todos ellos relacionados entre sí.

Un antimicrobiano con EPA y otras características favorables, implica que podría ser administrado con un intervalo mayor de tiempo sin perder eficacia, como sería el caso de aminoglicósidos y fluorquinolonas. Las ventajas son múltiples, comodidad para el paciente, reducción de efectos tóxicos, y ahorro de personal sanitario y material desechable.

5.1. FARMACOCINETICA

Diversos estudios han demostrado que el parámetro farmacocinético de

eficacia más importante no sólo en aminoglicósidos (como ya se señaló) sino también en fluorquinolonas, es la dosis total (ABC) y el pico máximo de concentración en suero (C_{máx}) por ello estos antimicrobianos son dependientes de la concentración (5, 22, 33, 46, 51, 76, 114, 141, 202, 216).

A priori, estos datos apoyan la dosificación intermitente con la administración de pocas dosis pero elevadas, para maximizar en lo posible estos parámetros (18). Por otra parte, en el EPA una mayor ABC y C_{máx} supondría mayor efecto bactericida y más tiempo de permanencia de las concentraciones de CMI y subCMI en suero, factores que influirían positivamente en el EPA puesto que los microorganismos tratados tardarían más tiempo en recuperarse. En humanos, la ABC y tiempo que se mantiene el pico máximo, estarían más aumentados debido a que el hombre elimina más lentamente el antimicrobiano que los ratones (42, 140, 202, 216), y por tanto, se podría adelantar que el EPA posiblemente sea mayor que en los animales pequeños.

5.2. RESISTENCIAS

Si las dosis se espacian, lo más probable es que las concentraciones de subCMI permanezcan durante largos intervalos de tiempo. Estas concentraciones pueden alargar el EPA como se comentó en fluorquinolonas pero también suponen un peligro por seleccionar subpoblaciones resistentes.

Legget (114) sugiere una resistencia funcional por retroregulación del transporte de los aminoglicósidos al interior bacteriano después de una primera exposición. Blaser y cols. (25) y Fernandes (65) encuentran que, en general, los resultados de una terapia más espaciada con enoxacina y netilmicina son mejores,

pero las bacterias vuelven a tasas de crecimiento normales en 24 h, cuando la $C_{m\acute{a}x} / CMI$ es menor de 8:1. Otros autores encuentran resistencias en diversas fluorquinolonas a concentraciones bajas de antimicrobiano (13, 35, 169).

Ante una situación de aparición de resistencias las defensas del huésped ayudarían a la eliminación de estas subpoblaciones bacterianas (entraríamos en el siguiente punto de discusión que es el efecto PALE), pero son necesarios más estudios con aislados clínicos microbianos que permitan seleccionar la dosificación adecuada en cada caso.

5.3. EFECTO PALE

El PALE, o mayor susceptibilidad de los microorganismos tratados a los mecanismos bactericidas de los polimorfonucleares (PMN), viene dado más que por la fagocitosis en la que sería fundamental la opsonización de la bacteria tratada, por un aumento en la vulnerabilidad de la bacteria a los mecanismos de muerte oxígeno-dependientes del PMN (3, 45, 112).

En esta mayor susceptibilidad intervienen por una parte, antimicrobianos que dañen la superficie bacteriana permitiendo así el paso de los factores oxidativos letales de los PMN (aminoglicósidos, betalactámicos). Por otra, Lorian y cols. (118, 119, 120, 121, 197) han observado un incremento de la actividad bactericida de los PMN con bacterias tratadas que han cambiado su morfología, respecto a las que tienen su forma normal.

Este fenómeno tendría un efecto beneficioso en el huésped inmunocomprometido y explicaría porqué algunos antimicrobianos disminuyen su

eficacia cuando se comparan la eficacia en huéspedes inmunocompetentes e inmunodeprimidos (112). Según estudios de Craig y cols. (42), utilizando el modelo de infección en muslo, encuentran que el EPA en ratones normales es mayor que el de neutropénicos; la explicación es que la acción de los PMN alargaría la recuperación de los microorganismos tratados. Esto mismo ha sido también observado por Fernandes en ratones normales y neutrópenicos (65).

Los estudios de PALE se han realizado la mayoría con concentraciones de subCMI (para evitar "perder" los microorganismos), y con una dosificación lo suficientemente espaciada "in vivo", estas concentraciones se obtendrían con facilidad (1). De hecho, Van der Auwera (197) observó que el aumento del EPA en aminoglicósidos debido a los leucocitos ocurría sobre todo a bajas concentraciones séricas y habitualmente desaparecía a concentraciones séricas $\geq 10\%$.

Por lo tanto este efecto, favorecido por niveles de antimicrobiano menores de su CMI, también sería un factor importante que ayudaría a prolongar el EPA y la eficacia clínica en la terapia intermitente.

5.4. EFECTO REFRACTARIO

Este efecto hace referencia a la menor susceptibilidad de los microorganismos a una segunda dosis de antimicrobiano durante la fase de EPA (73, 200), el mayor inconveniente es que se han realizado muy pocos estudios (casi todos "in vitro") y aún no se pueden hacer generalizaciones.

Se ha comprobado "in vivo" que la administración de ciertos aminoglicósidos a intervalos de 12 horas o en una sola dosis diaria, dió lugar a una eficacia similar

o mayor a la conseguida al administrar el aminoglicósido sólo cada 4 horas (42). Con lomefloxacino también se ha encontrado este efecto, aunque el término de refractario prácticamente no se utiliza "in vivo" (35). Posiblemente esté relacionado con la mayor efectividad del antimicrobiano frente a microorganismos en fase de crecimiento logarítmico, hecho que ocurriría cuando finaliza el EPA y la bacteria comienza a multiplicarse con tasas de crecimiento normal.

Este efecto apoya la dosificación a intervalos largos, puesto que sería inútil administrar un antimicrobiano más a menudo si éste tiene poca o ninguna actividad bactericida.

5.5. TOXICIDAD

En la terapia de aminoglicósidos diversos autores (49, 77, 159, 180, 194, 195, 198) han demostrado que, la toxicidad de una administración de dosis única (UD) es igual o menos tóxica que la de tres dosis diarias (TD), tanto en animales como en ensayos clínicos.

Con las fluorquinolonas los estudios realizados son menores pero prometedores, e igualmente indican que hay una buena tolerancia de las UD (128, 193, 199).

Si la toxicidad parece que es menor o igual en UD respecto a TD y la primera es más aconsejable, es indudable que los estudios de toxicidad apoyarían la dosificación a largos intervalos de tiempo.

6. LA DOSIFICACION UNICA EN LA TERAPIA ANTIMICROBIANA HUMANA

En el apartado anterior se han enumerado una serie de ventajas y puntos importantes que hay que tener en cuenta en los protocolos de dosificación, y todo parece indicar que, la probabilidad de éxito de la terapia UD puede ser posible. Aminoglicósidos y fluorquinolonas poseen dos de las características más importantes que apoyan esta dosificación que son 1) una acción bactericida rápida y eficaz, y 2) amplios EPA. Hay también estudios en los que se ha evaluado la eficacia antibacteriana o clínica, y ésta es igual o mejor que la terapia de TD (24, 128, 180, 193, 195, 197, 198, 199).

No obstante, en la práctica de la terapia antimicrobiana de dosificación única en el hombre, hay que considerar dos grupos de pacientes, los inmunocomprometidos y los inmunocompetentes.

6.1. PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS

En este tipo de pacientes su sistema inmunitario tendría mucho menor relevancia que en los pacientes normales. En ellos, además de no contar con esta importante defensa adicional, el PALE no tendría el mismo efecto ya que, aunque resultaría un factor beneficioso, no tendría una trascendencia significativa.

Habría que tener especial precaución con microorganismos susceptibles de variar su CMI (202) y sería muy importante comprobar previamente la sensibilidad de la bacteria al antimicrobiano en cuestión. Algunos estudios muestran que en los pacientes inmunodeprimidos, los intervalos de dosificación comprenderían tiempos

más cortos, entre 6 y 12 horas, que podrían abarcar la suma del EPA más el tiempo en que se mantiene el antimicrobiano por encima de la CMI (42, 77, 202).

Intervalos más prolongados (de hasta un día), se han conseguido en animales neutropénicos y normales tratados simultáneamente con aminoglicósidos y betalactámicos (42, 77). Estos hallazgos en una especie animal que elimina los aminoglicósidos a una velocidad seis veces superior a la del hombre, indican que la terapia combinada sería un punto importante en futuras investigaciones del EPA y su aplicación en la terapia de UD.

En el caso de las fluorquinolonas su combinación con un betalactámico puede ser también una posibilidad (124, 144a). Estos antimicrobianos presentan pocos efectos adversos, factor importante cuando la mayoría de estos pacientes son tratados con agentes que causan nefrotoxicidad y hepatotoxicidad; además en las nuevas quinolonas hay evidencia de una cierta actividad inmunomoduladora, que estimula la médula ósea, la producción de ciertas interleucinas y el factor estimulante de colonias, que puede resultar beneficiosa en pacientes neutropénicos (181).

6.2. PACIENTES INMUNOCOMPETENTES

En los pacientes inmunocompetentes este período entre dosis llegaría a ser de hasta un día, y la terapia combinada puede no ser necesaria (77), a menos que haya riesgo de resistencias debido a las concentraciones subinhibitorias, o que el antimicrobiano no cubra todo el espectro deseado.

Las dosis para fluorquinolonas podrían oscilar entre 200-1000 mg/día según

la sensibilidad y el EPA de los microorganismos. En aminoglicósidos la posología de 300-500 mg/día sería, al menos, tan eficaz y segura como la convencional de múltiples dosis diarias.

No obstante siempre hay que analizar todos los factores importantes que favorecen esta dosificación para evitar el fallo terapéutico o la aparición de resistencias. En estos factores no sólo están lo que se han comentado, sino otros que pueden influir en la buena respuesta del antimicrobiano como la mayor o menor oxigenación del tejido infectado (150, 153), pH, etc.; recientemente se ha visto que enoxacina, una fluorquinolona, disminuye la adherencia de E.coli a las células uroepiteliales a concentraciones de subCMI (30). Más estudios son necesarios para manejar correctamente un antimicrobiano y aprovechar al máximo todas sus propiedades, perjudicando lo menos posible al paciente.

VIII. CONCLUSIONES

En las conclusiones de este trabajo se mencionarán los resultados obtenidos en este estudio con los aminoglicósidos y las fluorquinolonas, una valoración objetiva del método experimental y las aplicaciones clínicas más relevantes del EPA.

De esta forma podemos concluir que:

- 1º) Los EPA "in vitro" con concentraciones superiores a la CMI de aminoglicósidos y fluorquinolonas frente a E.coli y S.aureus son menores que "in vivo", y tienen una media de duración de 2 horas, existiendo variaciones individuales según la técnica, tipo de antimicrobiano o especie de microorganismo.*
- 2º) La técnica de dilución del antimicrobiano para la evaluación del EPA "in vitro" resulta apropiada y sencilla de realizar, facilitándose además la comparación entre diversos autores por ser una de las más utilizadas.*
- 3º) Los EPA "in vivo" frente a S.aureus y E.coli con concentraciones superiores a la CMI son mayores en aminoglicósidos (media de 4 h) que en fluorquinolonas (media de 2.5 h), oscilando los primeros entre 3.1 y 5.1 h y los últimos entre 1.8 y 3.5 horas.*
- 4º) Las subCMI de lomefloxacin demostraron gran actividad sobre E.coli en fase de EPA de tal forma que, la supresión persistente del crecimiento bacteriano después de una exposición breve a lomefloxacin, es una consecuencia del tiempo de EPA como tal y la acción de dichas concentraciones subinhibitorias.*
- 5º) El modelo de infección en muslo de ratón neutropénico posee grandes ventajas de comodidad y manejo de los animales que le hacen muy apropiado para el*

estudio del EPA y otros efectos relacionados con él (PALE, tratamientos cortos, etc).

- 6º) *Las infecciones control de las concentraciones residuales en este modelo "in vivo" (que aseguran que el EPA es verdadero), deben ser revisadas, utilizándose en la exposición a las subCMI del antimicrobiano, bacterias en fase de EPA y no logarítmica.*
- 7º) *En los estudios de EPA "in vivo" sobre todo en el caso de antimicrobianos de vida media larga y/o con gran acción bacteriostática como fluorquinolonas y betalactámicos, es difícil separar el EPA como tal de la acción de las concentraciones subinhibitorias (no detectable por bioensayo). Puesto que dicha situación es la que se muestra en los animales y posiblemente en el hombre, habría que estudiar la posibilidad de incluir ambos efectos en el concepto de EPA "in vivo".*
- 8º) *El EPA, probablemente más amplio en el hombre, y otros factores como la farmacocinética, efecto PALE, efecto refractario y toxicidad, permitirían un régimen de dosificación con altas dosis a intervalos largos sin miedo a perder eficacia. Puede haber posibilidad de que aparezcan resistencias debido a las subCMI, siendo éste es un punto que debe ser más estudiado.*
- 9º) *En pacientes inmunocompetentes el período entre dosis puede ser de hasta un día, si bien en los inmunodeprimidos este intervalo sería de 6-12 h y abarcaría la suma del EPA más el tiempo en que se mantiene el antimicrobiano por encima de la CMI.*

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1) Ahlstedt S. 1981. The antibacterial effects of low concentrations of antibiotics and host-defense factors: a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8 (Suppl. C): 59-70.
- 2) Alados J.C., Maroto M.C., Liébana J., Piédrola G. 1989. Efecto postantibiótico y cinética de letalidad de dos quinolonas frente a aislados clínicos de Shigella sonnei. *Rev. Esp. Quimioter.* 2: 245-248.
- 3) Andreana A., Perna P., Utili R., Dilillo M., Ruggiero G. 1984. Increased phagocytosis and killing of E. coli treated with subinhibitory concentrations of cefamandole and gentamicin in isolated rat livers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25: 182-186.
- 4) Aoyama H., Matsuhisa I., Mitsuhashi S. 1988. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of fleroxacin, a new fluorinated quinolone. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 22 (Suppl. D): 99-114.
- 5) Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Roosendaal R. 1988. Impact of dosage regimens on the efficacy of antibiotics in the immunocompromised host. *J. Antimicrob. Chemother.*, 21: 145-147.
- 6) Baquero F. 1986. Postantibiotic effect of imipenem on gram positive and gram negative microorganisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (Suppl. E): 47-59.
- 7) Baquero F. 1991. Aspectos generales de los antibióticos antimicrobianos. En: *Plan de formación en enfermedades infecciosas. Módulo III: Antimicrobianos*, Ed. Médica Internacional S.A., pp: 11-40.
- 8) Barry A.L., Thornsberry C., Jones R.N., et al. 1980. Interpretive standards for disk susceptibility tests with Sch 21420 and amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18: 616-621.
- 9) Barry A.L., Jones R.N., Thornsberry C., Ayers L.W., Gerlach E.H. Sommers H.M. 1984. Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 25: 633-637.

- 10) Barry A.L., Gardiner R.V., Packer R.R. 1987. Bactericidal activities of ten different fluorquinolones against selected Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 6: 81-83.
- 11) Barza M. 1976. The effects of protein-binding on distribution of antibiotics and the problem of continuous versus intermittent infusions, including a review of some controversial aspects. *Infection*, 4(N^o2): s144-s148.
- 12) Barza M. 1978. A critique of animal models in antibiotic research. *Scand. J. Infect. Dis.*, 14(Supp.): 109-117.
- 13) Barza M., Cuchural G. 1985. General principles of tissue penetration. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15(Supp. A): 59-75.
- 14) Bauernfeind A., Eberlein E., Hörl G. 1988. Bactericidal kinetics of various dosages of fleroxacin simulated in bacterial cultures. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 22 (Suppl. D): 81-89.
- 15) Beam T.R. 1984. A critical appraisal of the role of animal models of infection for assessing antimicrobial activity. *Antimicrob. Newsletter*, 1: 67-76.
- 16) Bennett S.V., Craig W.A. 1985. Postantibiotics effects. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (Supp A): 37-46.
- 17) Bergan T., Carlsen I.B., Fuglesang J.E. 1980. An in vitro model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated in vivo conditions. *Infection*, 8: 96-102.
- 18) Bergan T. 1981. Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 45-66.
- 19) Bergan T. 1988. Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. In: Andriole VT (ed): *The quinolones*, Academic Press, London, P. 119-154.
- 20) Bergan T., Dalhoff A., Rohwedder R. 1988. Pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Infection.*, 16 (Suppl. 1): 3-13.
- 21) Bergeron M.G. 1978. A review of models for the therapy of experimental infections. *Scand. J. Infect. Dis.*, 14(Supp.): 189-206.

- 22) Bergeron M.G., Beauchamp D., Poirier A., Bastille. 1981. Continuous versus intermittent administration of antimicrobial agents: tissue penetration and efficacy in vivo. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 84-97.
- 23) Bigger J.W. 1944. The bactericidal action of penicillin on Staphylococcus pyogenes. *J. Med. Sci.*, 227: 533-568.
- 24) Blaser J., Stone B.B., Zinner S.H. 1985. Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a new two-compartment in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27: 343-349.
- 25) Blaser J., Stone B.B., Groner M.C., Zinner S.H. 1987. 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 and Chemother.*, 31: 1054-1060.
- 26) Bodey G.P., Pan T. 1976. Effect of cephalotin on growth patterns of microorganisms. *J. Antibiot.*, 29: 1092-1095.
- 27) Briedls D.J., Robson H.G. 1976. Comparative activity of netilmicin, gentamicin, amikacin and tobramycin against Pseudomonas aeruginosa and enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10: 592-597.
- 28) Bryan L.E., Bedard J. 1991. Impermeability to quinolones in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 232-239.
- 29) Bundtzen R.W., Gerber A.V., Cohn D.L., Craig W.A. 1981. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 28-37.
- 30) Burnham J.C. 1988. Mediation by enoxacin of adherence of Escherichia coli to uroepithelial cells. *Rev. Infec. Dis.* S-175.
- 31) Campoli-Richards D.M., Monk J.P., Price A., Benfield P., Todd P.A., Ward A. 1988. Ciprofloxacina: Una revisión de la actividad antibacteriana, propiedades farmacocinéticas y uso terapéutico. *Drugs (Reprint)*, 35: 373-447.

- 32) Cantón E., Gobernado M., Jimenez T., Izquierdo R., 1989. Lomefloxacin: Estudio de su actividad antibacteriana en el laboratorio. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 2: 237-244.
- 33) Carbon C. 1990. Significance of tissue levels for prediction of antibiotic efficacy and determination of dosage. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 510-516.
- 34) Cars O., Ogren S. 1981. A microtechnique for the determination of antibiotics in muscle. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8: 39-48.
- 35) Chambers S.T., Peddie B.A., Robson R.A. 1991. Antimicrobial effects of lomefloxacin in vitro. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 27: 481-489.
- 36) Chin N.X., Brittain D.C., Neu H. 1986. In vitro activity of Ro 23-6240, a new fluorinated 4-quinolone. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 29: 675-680.
- 37) Chin N.X., Neu H.C. 1987. Postantibiotic suppressive effect effect of ciprofloxacin against Gram positive and Gram negative bacteria. *Am. J. Med.* 82 (Suppl.4A): 58-62.
- 38) Chisholm G.D., Smith C.B., Waterworth P.M., Calman. 1976. Factors influencing the distribution of antibacterial agents in interstitial fluid: molecular size and protein binding. *Infection* 4: s123-s127.
- 39) Cleeland R., Grunberg E. 1980. Laboratory evaluation of new antibiotics in vitro and in experimental animal infections. pp: 506-548. En Lorian V. (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. 1ª ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- 40) Cooper M.A., Andrews J.M., Wise R. 1991. Bactericidal activity of sparfloxacin and ciprofloxacin under anaerobic conditions. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 28: 399-405.
- 41) Craig W.A. 1976. Tissue binding of antimicrobials: a brief review. *Infection* 4: 160-164.
- 42) Craig W.A., Leggett J., Totsuka K., Vogelmann B. 1988. Parámetros farmacocinéticos claves de la eficacia antibiótica en infecciones animales experimentales. *J. Drug Dev.* 1(Supp. 3): 7-15.

- 43) Craig W.A., Gudmundsson S. 1991. *The postantibiotic effect*. pp: 403-431. En Lorian V. (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. 3th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- 44) Crump B., Wise R., Dent J. 1983. *Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 24: 784-786.
- 45) Dalhoff A., Stübner G. 1985. *Comparative analysis of the antimicrobial action of polymorphonuclea leucocytes in vitro, ex vivo and in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (Suppl. A): 283-291.
- 46) Dalhoff A., Ullmann U. 1990. *Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 479-487.
- 47) Davis B.D. 1987. *Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides*. *Microbiological Rev.*, 51: 341-350.
- 48) Davis B.D. 1988. *The letal action of aminoglycosides*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22: 1-3.
- 49) De Broe M.E., Giuliano R.A., Verpooten G.A. 1986. *Choice of drug and dosage regimen. Two important risk factors for aminoglycoside nephrotoxicity*. *Am. J. Med.*, 80 (Suppl. 6B): 115-118.
- 50) D'Espine M., Bellido F., Pechère J.C. 1989. *Serum levels of ciprofloxacin after single oral doses in patients with septicemia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 8: 1019-1023.
- 51) Deziel-Evans L.M., Murphy J.E., Job M.L. 1986. *Correlation of pharmacokinetic indices with therapeutic outcome in patients receiveing aminoglycosides*. *Clin. Pharm.*, 5: 319-324.
- 52) Diver J.M., Piddock L.J.V., Wise R. 1990. *The acumulation of five quinolones antibacterial agents by Escherichia coli*. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 25: 319-333.
- 53) Dominguez Gil-Hurle A., Sanchez Navarro A. 1988. *Farmacocinética de la nuevas quinolonas*. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* 6: 208-212.

- 54) Drake T.A., Scheld W.M., Sande M.A. 1985. Effects of subbactericidal concentrations of antibiotics in experimental endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (Supp. A): 293-296.
- 55) Eagle H. 1949. The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Clin. Invest.*, 28: 832-836.
- 56) Eagle H., Musselman A.D. 1949. The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Bacteriol.*, 58: 475-490.
- 57) Eagle H., Fleischman R., Musselman A.D. 1950. The bactericidal action of penicillin in vivo: the participation of the host and the slow recovery of the surviving organisms. *Ann. Inter. Med.*, 33: 544-571.
- 58) Easmon C.S.F., Crane J.P., Blowers A. 1986. Effect of ciprofloxacin on intracellular organisms: in vitro and in vivo studies. *J. of Antimicrob. Chemother.* 18 (Suppl. D): 43-48.
- 59) Edberg S.C., Sabath L.D. 1980. Determination of antibiotic levels in body fluids: techniques and significance. *Bactericidal tests in endocarditis and other severe infections.* pp: 206-264. In: Lorian V. (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine.* 1^a ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- 60) Eickhoff T.C., Ehret J.M. 1977. In vitro activity of netilmicin, gentamicin and amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11: 791-796.
- 61) Escande M.C., Povart-Salmeron C., Lagrande P.H. 1989. Effects of selected antibiotics on experimental candidiasis in cyclophosphamide treated mice: an in vivo model to evaluate relationship. pp: 184-195. *The influence of antibiotics on the host-parasite III*, ed. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 62) Esposito S., Galante D., Barba D., et al. 1988. Efficacy and safety of ciprofloxacin in the treatment of UTIs and RTIs in patients affected by liver diseases. *Infection*, 16 (suppl. 1): 57-61.
- 63) Fantin B., Craig W.A. 1988. In vivo post-antibiotic effect of gentamicin against Enterobacteriaceae. In: *Programs and Abstracts of the Twenty-Eighth*

- Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 774, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 246.*
- 64) Fernandes P.B. 1988. Mode of action, and in vitro and in vivo activities of fluorquinolones. *J. Clin. Pharmacol.* 28: 156-168.
- 65) Fernandes P.B., Shipkowitz N., Swanson R.N. 1989. Comparative efficacy of the fluorquinolones in experimental animal infections: correlation with in vitro potency and pharmacokinetics. In: *Proceedings of an International Telesymposium on quinolones, Fernandes P.B. (Ed), J.R. Prous Science Publishers, Barcelona, pp: 255-268.*
- 66) Furet Y.X., Pechère J.C. 1991. Newly documented antimicrobial activity of quinolones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 249-254.
- 67) Fuursted K. 1987. Post-antibiotic effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6: 271-274.
- 68) Fuursted K. 1987. Post-antibiotic effect and killing activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B*, 95: 199-202.
- 69) García-Rodríguez J.A. 1988. *Microbiología de ciprofloxacina. Drus of today*, 24 (Suppl.8):1-10.
- 70) Gardner W.G., Prior R.B., Perkins R.L. 1973. Fluid and pharmacological dynamics in a subcutaneous chamber implants in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4: 196-197.
- 71) Georgopoulos A., Breyer S., Georgopoulos M. 1988. In-vitro activity of fleroxacin. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 22 (Suppl. D): 25-29.
- 72) Gellert M., Mizuchi K., O'Dea M.H. 1977. Nalidixic acid resistance: a second character involved in DNA gyrase activity. *Proc. National Acad. Sci. (USA)*, 74: 4772-4777.
- 73) Gerber A.U., Craig W.A. 1981. Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8: 581-591.

-
- 74) Gerber A.U., Wipracutiger P., Stettlon-Spichiger. 1982. Constant infusions vs intermittent doses of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *J. Infect. Dis.*, 145: 554-560.
- 75) Gerber A.U., Craig W.A., Brugger H.P., Feller C., Vastila A.P., Brandel J. 1983. Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice. *J. Infect. Dis.*, 147: 910-917.
- 76) Gerber A.U., Brugger H.V., Feller C., Stinzko T. Stalcher B. 1986. Antibiotic therapy of infections due to *pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. *J. Infect. Dis.*, 153: 90-97.
- 77) Gerber A.U. 1988. Comparación entre dosis equivalentes de aminoglicósidos administradas en una sola dosis o repartidas en tres dosis diarias: consideraciones básicas y enfoque experimental. *J. Drug Dev.*, 1(Supp. 3): 17-24.
- 78) Gobernado M., Santos M. Nov. 1988. Fluorquinolonas: Estructura, actividad in vitro, mecanismo de acción y resistencia. *Medicine.*, pag. 33-40.
- 79) Gordon R.C., Regamey C., Kirby W.M. 1972. Serum protein binding of the aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2: 214-216.
- 79a) Grove D.C., Randall W.A. 1955. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (antibiotics monograph 2). *Medical Encyclopedia*, New York.
- 80) Gudmundsson S., Turnidge J., Craig W.A. 1982. Effect of different dosage regimens on in vivo efficacy of antibiotic against *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Research*, 30: 777a.
- 81) Gudmundsson S., Turnidge J., Vogelmann B., Craig W.A. 1983. The postantibiotic effect in vivo, p. 68-71. In: K.H. Spitzky and K. Karrer (ed.), *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy*, part. 117. Verlag H. Egerman, Vienna.
- 82) Gudmundsson S., Vogelmann B. and Craig W. 1984. Postantibiotic effect for newer antimicrobials. In program and abstracts of the twenty-fourth Inters

- ciencia conference on American Society for Microbiology, Washington D. C., 1120, 289.
- 83) Gudmundsson S., Vogelmann B., Craig W.A. 1986. The in-vivo postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (Supp.E): 67-73.
- 84) Gutmann L., Williamson R., Moreau N et al. 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J. Infect. Dis.* 151: 501-507.
- 85) Hagstrom G.L., Luft F.C., Ym M.N., Sloan R.J. 1978. Nephrotoxicity of netilmicin in combinations with nonaminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13: 490-498.
- 86) Hancock R.E.W. 1981. Aminoglycoside uptake and mode of action-with especial reference to streptomycin and gentamicin. II Effects of aminoglycosides on cell. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8: 429-445.
- 87) Hare R.S., Miller G.H. 1986. Susceptibility of aminoglycoside resistant strains to isepamicin. Memo Dated December 22, Doc. N° d2o71322.
- 88) Heim-Duthoy K., Peltier G., Awni W. 1990. Steady-state pharmacokinetics of fleroxacin in patients with skin and skin structure infections. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 34: 922-923.
- 89) Hessen M.T., Pitsakis P.G. and Levison M.E. 1988. Absence of a postantibiotic effect in experimental pseudomonas endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. *J. Infect. Dis.*, 158: 542-548.
- 90) Hessen M.T., Pitsakis P.G. and Levison M.E. 1989. Absence of a postantibiotic effect in experimental left-sided *Streptococcus faecalis* endocarditis treated with penicillin plus gentamicin. 1989. pp: 222-225. *The influence of antibiotics on the host-parasite III*, ed. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 91) Hessen M.T., Pitsakis P.G. and Levison M.E. 1989. Absence of a

- postantibiotic effect in experimental left-sided Pseudomonas aeruginosa endocarditis treated with imipenem with or without gentamicin. 1989. pp: 226-230. The influence of antibiotics on the host-parasite III, ed. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.*
- 92) Hirai K., Aoyama H., Hosaka M. 1986. *In vitro and in vivo antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. Antimicrob. Agents and Chemother., 29: 1059-1066.*
- 93) Hohl P., Felber A.M. 1988. *Effect of method, medium, pH and inoculum on the in-vitro antibacterial activities of fleroxacin and norfloxacin. J. of Antimicrob. Chemother., 22 (Suppl. D): 71-80.*
- 94) Honorato J., Azanza J.R. 1988. *Ciprofloxacina: Características farmacocinéticas y experiencia en el tratamiento de las infecciones del aparato locomotor. Drugs of today, 24 (suppl. 8): 11-16.*
- 95) Honorato J., Suarez J.R., Azanza J.R. Nov. 1988. *Farmacología clínica de las fluorquinolonas. Medicine, pag. 41-47.*
- 96) Hooper D.C., Wolfson J.S. 1991. *Mode of action of the new quinolones: New data., 10: 223-231.*
- 97) Hunter P.A., Rolinson G.N., Witting D.A. 1973. *Comparative activity of amoxycillin and ampicillin in an experimental bacterial infection in mice. Antimicrob. Agents Chemother., 15 (Suppl.A): 285-293.*
- 98) Iida K., Koike M. 1974. *Cell wal alteration in gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother., 5: 95-97.*
- 99) Ilstrup D.M. 1990. *Statistical methods in Microbiology. Clin. Microbiol. Rev., 3: 219-226.*
- 100) Isaksson B., Nilsson L., Maller R., Sörén L. 1988. *Postantibiotic effect of aminoglycoside on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. J. Antimicrob. Chemother., 22: 23-33.*
- 101) Jones R.N., Barry A.L., Gavan T.L., Washington J.A. 1985. *Susceptibility*

- tests: microdilution and macrodilution broth procedures. pp: 972-977. En Lennette E.H., Balows A., Hausler Jr., Shadomy H.J. *Manual of clinical microbiology*, 4^a edicion, American Society for Microbiology, Washington.
- 102) Jones R.N., Aldridge K.E., Barry A.L. 1988. Multicenter in vitro evaluation of lomefloxacin (NY-198, SC-47111), including tests against nearly 7000 bacterial isolated and preliminary recommendations for susceptibility testing. *Diagnostic Microbiol. and Infect. Dis.*, 10: 221-240.
- 103) Kabins S.A., Nathan c. 1978. In vitro activity of sch 21420, a derivat of gentamicin B, compared to that of amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 786-787.
- 104) Kantor R.J., Norden C.W. 1977. In vitro activity of netilmicin, gentamicin and amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11: 126-131.
- 105) King A., Philips I. 1986. The comparative in vitro activity of eight newer quinolones and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 18 (Suppl. D): 1-20.
- 106) Kozak A.J., Gerdong D.N., Peterson L.R., Hall W.H. 1977. Gentamicin intravenous infussion rate: effect on interstitial fluid concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 12: 606-608.
- 107) Kucers A., Bennett N.M. 1979. *The use of antibiotcs. A comprehensive review with clinical emphasis.* 3^a ed. Londres. William Heinemann Medical Books Ltd. pp: 395-405.
- 108) Kunin C.M. 1970. Binding of antibiotics to tissue homogenates. *J. Infect. Dis.*, 121: 55-64.
- 109) Kunin C.M. 1981. Dosage schedules of antimicrobial agents: a historical review. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 4-11.
- 110) Kusajima H., Ishikawa N., Machida M. 1986. Pharmacokinetics of a new quinolone, AM-833, in mice, rats, rabbits, dogs, and monkeys. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 30: 304-309.
- 111) Laber G., Schutze E., Leskova R., Kolb R., Georgopoulos A. 1980. A

- diffusion chamber technique for measuring concentrations of antibiotics in interstitial fluids. Infection, 8: 58-62.*
- 112) Lam C., Georgopoulos A., Laber G., Schutze E. 1982. *In vitro and in vivo modulation of Escherichia coli susceptibility to PMN leukocyte microbicidal activity by a pyrazole cephalosporin derivate. pp: 242-254. The influence of antibiotics on the host-parasite relationship. Ed. Eickenberg, Hahn, Opferkuch, by Springer Verlag, Berlin Heidelberg.*
- 113) Lee C., Blaser J., Burchal J.J. 1982. *Postantibiotic effect (PAE) is markedly influenced by shaking conditions during exposure during to antibiotics concentrations. In: Program and abstracts on the twenty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract 383. American Society for Microbiology. Washington, D. C., pp. 133.*
- 114) Legget J.E., Fantin B., Ebert S. 1989. *Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. J. Infect. Dis., 159: 281-292.*
- 115) Leigh D.A., Harris C., Tait S., Walsh B., Hancock. 1991. *Pharmacokinetic study of lomefloxacin and its effect on the faecal flora of volunteers. J. Antimicrob. Chemother. 27: 655-662.*
- 116) Leigh D.A., Tait S., Walsh B. 1991. *Antibacterial activity of lomefloxacin. J. Antimicrob. Chemother., 27: 589-598.*
- 117) Lewin C.S., Morrissey I., Smith J.T. 1991. *The mode of action of quinolones: The paradox in activity of low and high concentrations and activity in the enviroment. Eur. J. Cli. Microbiol. Infect. Dis. 10: 240-248.*
- 118) Lorian V., Atkinson B. 1984. *Bactericidal effect of polymorphonuclear leukocytes on antibiotic induced filaments of gram-negative bacilli. J. Infect. Dis., 149: 719-727.*
- 119) Lorian V. 1985. *Low concentration of antibiotics. J. Antimicrob. Chemother., 15(Supp. A): 15-26.*
- 120) Lorian V., Joyce D.M., Kim Y. 1985. *Ultrastructure and reversion of*

- bacterial filaments produced by ciprofloxacin. In: Recent Advances in Chemotherapy - Antimicrobial Section 2, Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy Kyoto, 1985 (Ishigami J. Ed.), pp. 1545-1546. University of Tokyo Press, Tokyo.*
- 121) Lorian V., Tosch W., Joyce D. 1985. *Weight and morphology of bacteria exposed to antibiotics. pp: 65-72. The influence of antibiotics on the host-parasite II, ed. Adam D., Hahn H., Opferkuch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.*
- 122) Lorian V., Ernst J., Amaral L. 1989. *The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology. J. Antimicrob. Chemother., 23: 485-491.*
- 123) Luft F.C., Yun M.N., Kleit S.A. 1976. *Comparative nephrotoxicities of netilmicin and gentamicin in rats. Antimicrob. Agents Chemother., 10: 845-849.*
- 124) Maiche A.G. 1991. *Use of quinolones in the immunocompromised host. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10: 361-367.*
- 125) Manek N., Andrews J.M., Wise R. 1986. *In-vitro activity of Ro 23-6240, a new difluoroquinolone derivative, compared with that of other antimicrobial agents. Antimicrob. Agents and Chemother., 30: 330-332.*
- 126) Manek N., Wright R., Telep E. 1986. *The postantibiotic effect of imipenem. J. Antimicrob. Chemother., 18: 641-649.*
- 127) Mañá J., Sanchez A., Gatell J.M. 1985. *Avances en agentes antimicrobianos: Netilmicina. Enf. Infecc. Microbiol. Clin. 3: 53-59.*
- 128) Marklein G., Stark G.B. Schmitz A. 1988. *Clinical and antibacterial efficacy of ciprofloxacin after single-shot prophylaxis during cholecystectomy. In: Ciprofloxacin: Microbiology-Pharmacokinetics-Clinical experience, Selected papers from the 6th Mediterranean Congress of Chemotherapy, 22-27 May, Taormina (Italy), Percival A. and Nicoletti G. (Ed), pp: 171-174.*
- 129) Mattie H. 1981. *Kinetics of antimicrobial action. Rev. Infect. Dis., 3: 19-27.*
- 130) Mattie H., Kunst M.W. 1976. *The in vivo significance of tissue concentration.*

- Infection*, 4: s164-s167.
- 131) Mc. Cormack J.P., and Schentag J.J. 1987. Potential impact of quantitative susceptibility tests on the design of aminoglycoside dosing regimens. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 21: 187-192.
- 132) Mc. Donald P.J., Craig W.A., Kunin C.M. 1976. Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth. *Chemotherapy*. Ed Williams J.D. and Geddes A.M. (Ny), 2: 95-102.
- 133) Mc. Donald P.J., Craig W.A., Kunin C.M. 1977. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.*, 135: 217-223.
- 134) Mc. Donald P.J., Wetherall B.L., Pruell H. 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocyte. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 38-44.
- 135) Meng X., Nightingale C.H., Sweeney K.R. 1991. Quantification of in-vitro post-antibiotic effect based on the mean recovery-time. I: Theoretical perspectives and practical procedure. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28: 505-514.
- 136) Meng X., Nightingale C.H., Sweeney K.R. 1991. Quantification of in-vitro post-antibiotic effect based on the mean recovery-time. II: A comparison of colony counting versus photometric methods for the determination of bacterial growth. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28: 515-521.
- 137) Meyers B.R., Hirschman S.Z., Wormser G., Siegel D. 1977. Pharmacokinetic study of netilmicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 12: 122-123.
- 138) Miller G.H., Chiu P.J.S., and Waitz J.A.. 1978. Biological activity of Sch 21420, the 1-N-S-alfa-hydroxy-beta-aminopropionyl derivate of gentamicin B. *J. Antibiot.*, 31: 688-696.
- 139) Minguez F., Izquierdo J., Martín M., Fuentes F., Prieto J. 1991. In vivo postantibiotic effect of isepamicin and other aminoglycosides in a thigh infection model in neutropenic mice. *Chemotherapy*. (In press).

- 140) Mizen L., Woodnutt G. 1988. A critique of animal pharmacokinetics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 21: 273-280.
- 141) Moore R.D., Lietmen P.S., and Smith C.K. 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy importance of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J. Infect. Dis.*, 155: 93-99.
- 142) Morrison P.J., Mant T.G.K., Norman G.T. 1988. Pharmacokinetics and tolerance of lomefloxacin after sequentially increasing oral doses. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 32: 1503-1507.
- 143) Nakashima M., Kanamaru M., Uematsu T. 1988. Clinical Pharmacokinetics and tolerance of fleroxacin in healthy male volunteers. *J. of Antimicrobial Chemother.*, 22 (Suppl. D): 133-144.
- 144) Neu H.C. 1989. Las quinolonas: expectativas ante el futuro. En: *Las quinolonas*, Andriole V.T. (Ed). Academic Press, London, pp: 259-278.
- 144a) Neu H.C.. 1991. Sinergy and antagonism of combinations with quinolones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 255-261.
- 145) Nightingale. 1987. Clinical limitations of in vitro testing of microorganism susceptibility. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 44: 131-137.
- 146) Nordström L., Ringberg H., Cronberg S., Walder M. 1990. Does administration of an aminoglycoside in a single dose affect its efficacy and toxicity?. *J. Antimicrob. Chemother.*, 25(Nº1): 159-174.
- 147) Norrby S.R. 1991. Side-effects of quinolones: Comparisons between quinolones and other antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 378-383.
- 148) Odenholt I., Holm S.E., Cars O. 1988. An in vivo model for evaluation of the postantibiotic effect. *Scand. J. Infect. Dis.*, 20: 97-103.
- 149) Odenholt I., Holm S.E., Cars O. 1989. Effects of benzylpenicillin on *Streptococcus pyogenes* during the postantibiotic phase in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24: 147-156.
- 150) Ollodart R.M., 1966. Effects of hiperbaric oxygenation and antibiotics on anaerobic microorganisms. In I.W.Brown, J.R., B. G. Cox (ed), *Proceedings*

- of the Third International Conference on Hyperbaric Medicine. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- 151) Oshida T., Onta T., Nakanishi N. 1990. Activity of sub-minimal inhibitory concentration of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against Staphylococcus aureus. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 26: 29-38.
- 152) Panneton A.C., Bergeron M.G., LeBel M. 1988. Pharmacokinetics and tissue penetration of fleroxacin after single and multiple 400- and 800-mg dosage regimens. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 32: 1515-1520.
- 153) Park M.K., Muhvich K.H., Myers R.A.M. 1991. Hyperoxia prolongs the aminoglycoside-induced postantibiotic effect in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 691-695.
- 154) Parker R.F., Marsh H.C. 1946. The action of penicillin on staphylococcus. *J. Bacteriol.*, 51: 181-186.
- 155) Phillips I. 1982. Aminoglycosides. *Lancet*, 2: 311-315.
- 156) Phillips I., Culebras E., Moreno F., Baquero F. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 20: 631-638.
- 157) Piddock L.J.V., Hall M.C., Wise R. 1990. Mechanism of action of lomefloxacin. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 34: 1088-1093.
- 158) Piddock L.J.V. 1991. Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells. *J. Antimicrob. Chemother.*, 27: 399-403.
- 159) Powel S.H., Thompson W.L., Luthe M.A., Stern R.C., Grossnikkaus D.A., Bloxhan D.D. et al. 1983. Once-daily versus continuous aminoglycoside dosing: efficacy and toxicity in animal and clinical studies of gentamicin, netilmicin and tobramycin. *J. Infect. Dis.*, 147: 910-932.
- 160) Rahal J.J., Simberkoff M. 1978. Comparative in vitro activity of Sch 22591, Sch 21420, gentamicin, amikacin and netilmicin. 18th Intersci. Conference Antimicrob. Agents Chemother., Am. Soc. Microbiol. Atlanta, GA, 1-4 Oct.
- 161) Raws A.G., van Klingereren B. 1978. Estimation of antibiotic levels in interstitial fluid from whole tissue levels. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl)* 14: 186-188.

- 162) Renneberg J., Walder M. 1988. A mouse model for simultaneous pharmacokinetics and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22: 51-60.
- 163) Renneberg J., Walder M. 1989. Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin and amikacin in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 1714-1720.
- 164) Rescott D.L., Nix D.E., Holden P., Schentag J.J. 1988. Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 32: 450-453.
- 165) Riff L.J., Moreschi G. 1977. Netilmicin and gentamicin. Comparative pharmacology in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 609-614.
- 166) Rolinson G.N. 1973. Plasma concentrations of penicillin in relation to the antibacterial effect. In: D.S. Davies and B.N.C. Prichardt (ed.), *Biological effects of drugs in relation to their plasma concentrations*. University Park Press. Baltimore, pp. 183-189.
- 167) Roosendaal R., Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Van Den Berg J.C., Michel M.F. 1985. Therapeutic efficacy of continuous versus intermittent administration of ceftazidime in an experimental *Klebsiella pneumoniae pneumonia* in rats. *J. Infect. Dis.*, 152: 373-378.
- 168) Rozek S.L. 1984. The aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Newslett.* 1: 51-58.
- 169) Rustige C., Wiedemann B. 1990. Antibacterial activity of lomefloxacin in a pharmacokinetic in vitro model. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 34: 1107-1111.
- 170) Ryan D.M. 1979. Implanted cotton threads; a novel model for measuring concentration of antibiotic in tissue fluid. *J. Antimicrob. Chemother.*, 5: 735-736.
- 171) Ryan D.M., Cars O. 1980. Antibiotic assays in muscle: are conventional tissue levels misleading as indicator of the antibacterial activity?. *Scand. J. Infect. Dis.*, 12: 307-309.

- 172) Ryan D.M., Cars O., Hoffstedt B. 1986. The use of antibiotic serum levels to predict concentrations in tissues. *Scand. J. Infect. Dis.*, 18: 381-388.
- 173) Sande M.A., Korzeniowski O.M., Allegro G.M., Brennan R.O., Zak O., Scheld W.M. 1981. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to S. pneumoniae in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 98-109.
- 174) Sanders C.C., Sanders W.E., Goering R.V. 1978. In vitro studies with Sch 21420 and Sch 22591: activity in comparison with six other aminoglycosides and synergy with penicillin against enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 187-184.
- 175) Sanders C.C., Sanders W.E., Goering R.V., Werner V. 1984. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 26: 797-801.
- 176) Sato K., Inoue Y., Fujii T., Aoyama H. 1986. Purification and properties of DNA gyrase from fluoroquinolone-resistant strain Escherichia coli. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 30: 777-780.
- 177) Schafer F., and Norden C.W. 1982. Activity of amikacin, gentamicin and Sch 21420 when combined with carbenillin or piperacillin against Pseudomonas aeruginosa. *Chemotherapy*, 28: 235-256.
- 178) Scheld W.M. 1991. Evaluation of quinolones in experimental animal models of infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 275-290.
- 179) Schlaeffler F., Blaser J., Laxon J., Zinner S. 1990. Enhancement of leucocyte killing of resistant bacteria selected during exposure to aminoglycosides or quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.*, 25: 931-940.
- 180) Schwarz A. 1988. Revisión de la eficacia e inocuidad de la netilimicina administrada una sola vez al día, en comparación con los protocolos de varias administraciones. *J. Drug. Dev. 1 (Suppl. 3)*: 147-154.

-
- 181) Shalit I. 1991. Immunological aspects of new quinolones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 262-266.
- 182) Shen L.L., Pernet A. 1985. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogs of nalidixic acid: the target of the drug is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82: 307-311.
- 183) Shibata Y., Totsuka K., Shimizu K. 1991. Postantibiotic effects and effective regrowth times of new quinolones. Abstracts of 17th International Congress of Chemotherapy, Abstract 661, Futuramed ed. Berlín (Federal Republic of Germany), June 23-28.
- 184) Shimizu K., Totsuka K., Yamaji S., Morohoshi T., Shiritani Y., Yokoiyama S. 1988. Postantibiotic effect of isepamicin. A new aminoglycoside antibiotic. In: *Programs and Abstracts of the Twenty-Eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abstract 939, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 258.
- 185) Simon C., Stille W., Perea E.J. 1987. Aminoglicosidos. pp: 178-205. *Manual de terapéutica microbiana*. Ed. Salvat.
- 186) Smith J.T., Lewin C.S. 1988. Chemistry and mechanisms of action of the quinolone antibacterials. In: Andriole VT (ed): *The quinolones*. Academic Press, London, p. 23-82.
- 187) Stone J.W., Andrews J.M., Ashby J.P. 1988. Pharmacokinetics and tissue penetration of orally administered lomefloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 1508-1510.
- 188) Täuber M.G., Zak O., Scheld W.M., Hengstler B., Sande M.A. 1984. The postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. *J. Infect. Dis.*, 149: 575-584.
- 189) Tano T. 1981. Studies on chemotherapy of experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in mice with lung injury. *Chemotherapy (Tokyo)*, 29: 458-470.
- 190) Thornsberry C., Barry A.L., Jones R.N. 1980. Comparison of in vitro activity

- of Sch 21420, a gentamicin B derivative, with those of amikacin, gentamicin, netilmicin, sisomicin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18: 338-345.
- 191) Toothaker R.D., Welling P.G., Craig W.A. 1982. An in vitro model for the study of antibacterial dosage regiment design. *J. Pharm. Set.* 71: 861-864.
- 192) Totsuka K., Fukada T., Hasegawa M., Watanabe T., Shimizu K. 1989. Duration of PAEs of new quinolones. In *Abstracts of the 16th International Congress of Chemotherapy. Jerusalem, Israel*, p. 28.
- 193) Traisupa A., Wongba C., Tesavibul. 1988. Efficacy and safety of a single dose therapy of a 500 mg ciprofloxacin tablet in chancroid patients. *Infection*, 16 (Suppl. 1): 44-45.
- 194) Tran Ba Huy P. 1988. Ototoxicidad de los aminoglicósidos: influencia del protocolo de administración sobre la captación del fármaco y correlación entre la unión a la membrana y las características clínicas. *J. Drug Dev.*, 1 (Suppl. 3): 93-96.
- 195) Tulkens P.M. 1991. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 100-106.
- 196) Van der Auwera P. 1988. Actividad bactericida, tasa de destrucción bacteriana y efecto postantibiótico en el suero de enfermos con infecciones urinarias tratados con netilmicina 6 mg/kg diarios, en comparación con 2 mg/kg tres veces diarias. *J. Drug Dev.*, 1 (Suppl. 3): 25-34.
- 197) Tulkens P.M., Clerckx-Braun F., Donnez J., Ibrahim S., Kallay Z., et al. 1988. Inocuidad y eficacia de los aminoglicósidos administrados una sola vez al día: datos experimentales y valoración aleatoria y controlada en pacientes con enfermedad pélvica inflamatoria. *J. Drug Dev.*, 1(Suppl. 3): 71-82.
- 198) Van der Auwera P., Meunier S.I., Kauffman L. 1991. Pharmacodynamic parameters and toxicity of netilmicin (6 milligrams/kilogram/day) given once daily or three divided doses to cancer patients with urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 640-647.

-
- 199) Vestweber K.H., Viell B., Schaff S., Scholl H. 1988. Perioperative prophylaxis in colorectal surgery: Is a single-shot with 200 mg ciprofloxacin sufficient to maintain therapeutic levels in gut tissues? *Ciprofloxacin: Microbiology-Pharmacokinetics-Clinical experience, Selected papers from the 6th Mediterranean Congress of Chemotherapy, 22-27 May, Taormina (Italy), Percival A. and Nicoletti G. (Ed), pp: 171-174.*
- 200) Vogelman B., Gudmundsson S., Craig W. 1983. Reduced susceptibility of bacteria during the postantibiotic effect (PAE) to bactericidal antimicrobials. *In program and abstracts of the twenty-third Interscience Conference on Antimicrobials Agents and Chemother. Abstract 895. American Soc. for Microbiology. Washington D.C. pp: 249.*
- 201) Vogelman B.S., Craig W.A. 1985. Postantibiotic effects. *J. Antimicrob. Chemother., 15 (Suppl. A): 37-41.*
- 202) Vogelman B., Gudmundsson S., Leggett J., Turnidge J. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. of Infect. Dis., 158: 831-847.*
- 203) Vogelman B., Gudmundsson S., Turnidge J. 1988. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J. Infect. Dis., 157(Nº2): 287-298.*
- 204) Weidekamm E., Portmann R., Partos C., Dell D. 1988. Single and multiple dose pharmacokinetics of fleroxacin. *J. of Antimicrob. Chemother., 22 (Suppl. D): 145-154.*
- 205) Welling P.G., Baummueller A., Lau C.C. 1977. Netilmicin pharmacokinetics after single intravenous doses to elderly male patients. *Antimicrob. Agents Chemother., 12: 328-334.*
- 206) Wilson D.A., Rounson G.N. 1979. The recovery period following exposure of bacteria to penicillins. *Chemother., 25: 14-22.*
- 207) Wise R., Lister D., McNulty C.A.M. et al. 1986. The comparative pharmacokinetics and tissue penetration of four quinolones. Including intravenously administered enoxacin. *Infection, 14: 196-202.*

-
- 208) Wise R., Andrews J.M., Ashby J.P. 1988. *In vitro* activity of lomefloxacin, a new quinolone antimicrobial agent, in comparison with those of other agents. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 32: 617-622.
- 209) Wolfson J.S., Hooper D.C. 1989. Fluorquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2: 378-424.
- 210) Wolfson J.S., Hooper D.C. 1991. Pharmacokinetics of quinolones: newer aspects. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 267-274.
- 211) Youngs D.J., Tudor R.G., Yoshioka K., Keighley M.R.B. 1988. The penetration of fleroxacin into intra-abdominal abscesses. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 22 (Suppl. D): 115-118.
- 212) Zak O., Kradolfer F. 1979. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics in experimental infections. *Rev. Infect. Dis.*, 1: 862-879.
- 213) Zak O., Tosch W., Sande M.A. 1985. Correlation of antibacterial activities of antibiotics *in vitro* and *in vivo* in animal models of infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (Suppl.A): 273-282.
- 214) Zak O., Sande M.A. 1988. Introduction: the role of animal models in the evaluation of new antibiotics. *Experimental models in antimicrobial Chemotherapy. Academic Press. Inc. (London)*, 1: 1-5.
- 215) Zak O., O'Reilly T. 1990. Animal models as predictors of the safety and efficacy of antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 472-478.
- 216) Zak O., O'Reilly T. 1991. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 35: 1527-1531.
- 217) Zhanel G.G., Davidson R.J., Hoban D.J. 1990. Reproducibility of the *in vitro* postantibiotic effect of fluorquinolones against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 724-726.
- 218) Zinner S.H., Husson M., Klastersky J. 1981. An artificial capillary *in vitro* kinetics model of antibiotic bactericidal activity. *J. Infect. Dis.* 144: 583-587.