

18.881

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

Tesis Doctoral



* 5 3 0 9 5 5 8 5 4 9 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS
SOBRE LAS
INTERACCIONES FAGOCITOS-MICROORGANISMOS.

Ricardo Nique Garcia

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ricardo Nique Garcia', with a stylized flourish at the end.

1993



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
 FACULTAD DE MEDICINA
 UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
 28040 MADRID

JOSE PRIETO PRIETO CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
 DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
 MADRID:

INFORMO: Que el presente trabajo de investigación,
 titulado: "Estudio del efecto de los anti-
 microbianos sobre las interacciones fagocitos-
 microorganismos" constituye la memoria presentada
 por Ricardo Nique Garcia para aspirar al Titulo
 de Doctor en Biología, y ha sido realizado
 integramente en los laboratorios de este
 departamento bajo mi dirección.

Y para que conste, expido y firmo el
 presente en Madrid, Octubre de mil novecientos
 noventa y tres.

Fdo.: J. Prieto Prieto

A mi familia

INDICE

AGRADECIMIENTOS. 1

ABREVIATURAS. 2

JUSTIFICACIÓN. 3

1.- INTRODUCCION. 6

1.- Introducción al sistema inmunitario. 6

2.- Macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. 8

2.1.- Origen y desarrollo. 8

2.2.- Características funcionales. 11

3.- Características de los microorganismos elegidos. 25

3.1.- Escherichia coli. 25

3.2.- Staphylococcus aureus. 30

3.3.- Candida albicans. 33

4.- Efecto de los antimicrobianos sobre las células fagocíticas. 37

5.- Características de los antimicrobianos elegidos. 45

5.1.- Cefotaxima. 45

5.2.- Netilmicina. 47

5.3.- Fluconazol. 51

2.- OBJETIVOS. 55

3.- MATERIALES y MÉTODOS. 58

3.1.- Material. 59

3.2.- Metodología. 66

3.2.1.- Efecto directo de los AM sobre las funciones implicadas en los mecanismos microbicidas de los MPM. 66

3.2.1.1.- Concentraciones de los antibióticos estudiados.	66
3.2.1.2.- Obtención y recuento de los MPM.	66
3.2.1.3.- Adherencia.	68
3.2.1.4.- Estudio de la movilidad del MPM.	69
3.2.1.5.- Adhesión y fagocitosis.	72
3.2.2.- Efecto indirecto de los AM actuando sobre la susceptibilidad de <u>E. coli</u> , <u>S. aureus</u> y <u>C. albicans</u> frente a los mecanismos microbicidas de los PMN.	75
3.2.2.1.- Microorganismos y antimicrobianos.	75
3.2.2.2.- Ajuste de los microorganismos por densidad óptica.	75
3.2.2.3.- Obtención y recuento de los PMN.	76
3.2.2.4.- Estudio del efecto con bacterias.	79
3.2.2.5.- Estudio del efecto con cándidas.	84
3.2.3.- Análisis estadístico.	87
4.- RESULTADOS, TABLAS Y GRÁFICAS	88
4.1.- Resultados obtenidos.	89
4.2.- Tablas.	96
4.3.- Gráficas.	118
5.- DISCUSIÓN.	151
6.- CONCLUSIONES.	176
7.- BIBLIOGRAFIA.	179

AGRADECIMIENTOS

Al **Prof. José Prieto Prieto**, Catedrático del Dpto. de Microbiología, por su eficaz dirección, así como por su constante estímulo para poder llevar a cabo la realización de la presente memoria.

Al **Prof. Fernando Mínguez**, por su ayuda, comprensión y amistad, durante la realización del mismo.

Al **Prof. Ramón Hernandez Verduzco**, por haberme iniciado en la investigación científica.

A **Fernando Gaviria**, por su valiosa aportación en el desarrollo y puesta a punto de las técnicas empleadas.

A **Mario**, compañero de fatigas durante tantas horas de trabajo en común, alegrías y discusiones.

A **Ana**, por su ayuda en la redacción y mecanografiado de esta memoria.

Al **Prof. Eduardo De Miguel**, por su ayuda desinteresada en el análisis estadístico de los resultados.

A **Quique** y en general a todos los miembros del departamento por su colaboración e interés.

ABREVIATURAS

- Ac. Anticuerpo.
Ag. Antígeno.
AM. Antimicrobiano.
CMI. Concentración mínima inhibitoria.
CPA. Célula presentadora de antígeno.
CI₅₀. Concentración de antifúngico que inhibe el 50% de crecimiento.
CFS. Factor estimulante de colonias.
C3bR. Receptor para la fracción 3b del complemento.
D.O. Densidad óptica.
E.B. Efecto bactericida de los PMN debido al tratamiento antibiótico de las bacterias.
HBSS. Solución fisiológica de Hank's.
I.A. Índice de adherencia.
IL-1. Interleukina 1.
Ig. Inmunoglobulina.
MPM. Macrófagos peritoneales murinos.
M-H. Medio nutritivo para bacterias; MÜeller.Hinton
PMN. Leucocitos polimorfonucleares.
PBP. Proteinas de unión de la penicilina.
PBS. Tampón fosfato.
R.C. Retraso del crecimiento bacteriano debido al AM.
T-S. Medio nutritivo para bacterias; Triptona.Soja.
UFC. Unidades formadoras de colónias.
YNB. Medio nutritivo para hongos; Yeast Nitrogen base medium.
%T_C. Porcentaje de transmitancia de la suspensión control.

JUSTIFICACIÓN

La evolución de las enfermedades infecciosas depende esencialmente tanto de la eficacia de las células fagocíticas para ingerir y destruir microorganismos como de la aplicación de una antibioterapia adecuada. Esto hace que sea necesario conocer las interacciones que se establecen entre microorganismos, células fagocíticas y antimicrobianos (1). Los esfuerzos se han dirigido, fundamentalmente, a desarrollar fármacos con un espectro de acción cada vez mayor y a controlar la posible aparición de resistencias a los mismos. Sin embargo ultimamente existe un creciente interés por el estudio de las interacciones fagocito-antibiótico y sus implicaciones clínicas (2).

Los antibióticos pueden interferir en la relación leucocito-microbio de varias formas, el efecto más conocido son las neutropenias inducidas. Por otro lado, el fagocito puede proveer de una protección a los microorganismos frente al antimicrobiano, así se ha podido comprobar como algunos de estos agentes son incapaces de penetrar en la célula perdiendo así su eficacia.

Pueden también interferir directamente con las células fagocíticas modificando su capacidad de quimiotaxis e ingestión, por último los antibióticos a ciertas concentraciones pueden modificar la superficie del microorganismo estimulando secundariamente la capacidad funcional de los leucocitos.

Salvo la aparición de neutropenia o agranulocitosis, comprobada en relación con la administración de determinados antibióticos, los otros efectos se han estudiado fundamentalmente "in vitro" y no se conoce el alcance de su significado ni su repercusión clínica.

Sin embargo, estos hechos no pueden ser ignorados y hoy en día se puede adelantar que el estudio tanto de las interacciones entre fagocitos, antibióticos y microorganismos como de los mecanismos implicados en ellas modificarán la aplicación de la terapia antimicrobiana.

Estos estudios pueden cobrar una mayor importancia si consideramos que el efecto sobre enfermos inmunocomprometidos es determinante a la hora de adquirir infecciones oportunistas, micóticas y bacterianas. En estos casos lo ideal sería poder utilizar fármacos que a la vez que actuaran sobre el microorganismo patógeno facilitaran la labor del macrófago como célula responsable de la etapa previa al desencadenamiento de la respuesta inmune específica (presentación de antígenos) así como en la capacidad bactericida de los polimorfonucleares neutrófilos.

Por todo ello creemos estar en un buen momento para realizar este estudio con dos antibióticos y un antifúngico de gran uso clínico.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN AL SISTEMA INMUNITARIO

Nuestro medio entorno contiene una gran diversidad de agentes microbianos como son los virus, bacterias, hongos y parásitos. Todos ellos si se multiplicaran de forma incontrolada dentro del huésped podrían llegar a provocar su muerte, pero en la realidad en individuos normales, la gran mayoría de las infecciones son de duración limitada. Esto se debe a que el sistema inmunitario combate estos agentes infecciosos.

Se conocen dos tipos de inmunidad:

* Inmunidad Innata (inespecífica). Actúa como primera línea de defensa. Aquí se incluyen todas las barreras físico-químicas de las superficies corporales y el sistema retículo endotelial (SRE) compuesto por las diferentes clases de células fagocíticas.

* Inmunidad adaptativa (específica). Aparece tras la interacción entre el agente reconocido como extraño y el propio sistema inmune, generándose una memoria inmunológica para el agente que la puso en marcha. Es por tanto la que confiere al sistema inmunitario las tres propiedades que mejor la caracterizan: especificidad, memoria y discriminación propio no propio.

El sistema inmune comprende un conjunto heterogéneo de clases celulares interrelacionadas entre sí (3), que proceden de células pluripotenciales a través de dos líneas principales de diferenciación.

- La línea linfoide, que dará lugar a los linfocitos.
- La línea mieloide, origen de las células fagocíticas.

Las células fagocíticas se subdividen en dos clases básicas: los monocitos, que al pasar a los tejidos se transforman en macrófagos, y los granulocitos polimorfonucleares, que pueden agruparse en neutrófilos, basófilos y eosinófilos, según la tinción histológica de sus gránulos.

Todos ellos poseen la capacidad de dirigirse hacia el lugar de la inflamación atraídos por un gradiente de concentración de sustancias quimioatrayentes (quimiotaxis), y una vez allí, reconocer al agente causal, unirse a él, englobarlo y destruirlo.

2.- MACRÓFAGOS Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

2.1.- ORIGEN Y DESARROLLO.

Hace aproximadamente un siglo, Metchnikoff (4) observó que los leucocitos ingerían partículas y que esta propiedad era indispensable para la defensa del organismo humano frente a ciertas enfermedades, desde entonces, los progresos en el conocimiento de las células con capacidad de fagocitosis (fagocitos) se han sucedido de forma ininterrumpida, merced al estudio tanto de los fagocitos normales como de aquellos que presentan alteraciones funcionales.

Los granulocitos neutrófilos, junto con los monocitos y macrófagos histiocitos constituyen los verdaderos "guardianes" móviles del organismo contra la infección bacteriana, circunstancia que ha motivado la denominación de "fagocitos profesionales", a diferencia de los linfocitos, plaquetas y hematies que carecen de capacidad fagocítica.

Tanto los leucocitos polimorfonucleares (PMN) como los macrófagos proceden de las mismas células primitivas de la médula ósea, así estas células se diferenciaron en monoblastos y mieloblastos (Fig. 1), los monoblastos exhiben escasa avidez por las superficies vitreas, son escasamente fagocíticas y su movilidad es lenta. En una fase posterior del desarrollo, células definidas como promonocitos presentan adherencia al vidrio. Su tamaño es relativamente grande (de 10 a 20 micras de diámetro), su cociente citoplasma-núcleo

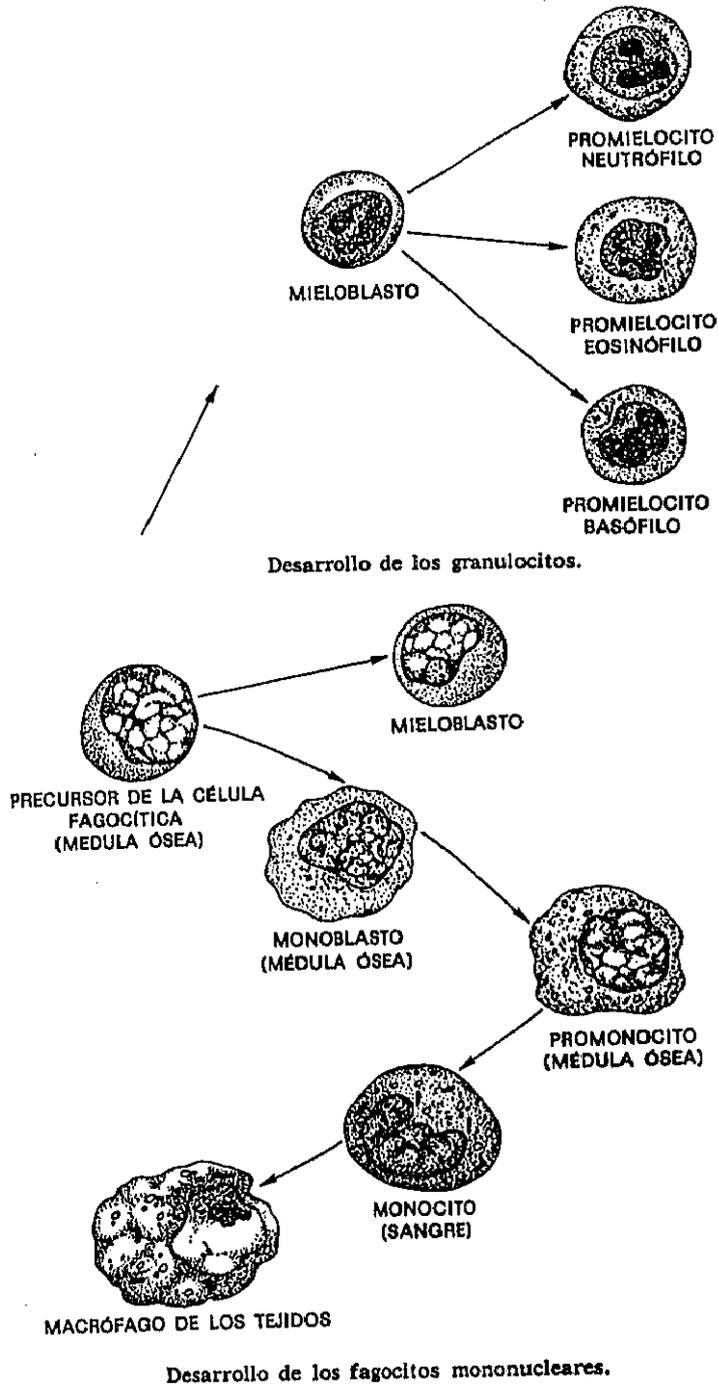


Figura 1. Origen y desarrollo de los macrófagos y neutrófilos (tomada de Alexander y Good, 1980).

es alto y poseen citoplasma basófilo. Presentan un aparato de golgi desarrollado, granulos azurófilos y prelisosomas. Estas células parecen capaces de ejercer endocitosis pero raramente la fagocitosis. El siguiente paso de desarrollo son los monocitos, células mononucleares de gran tamaño (de 10 a 18 micras de diámetro) con un núcleo central escotado y un citoplasma que se tiñe de azul grisáceo con el colorante de Wright, aparato de golgi desarrollado y mitocondrias uniformemente distribuidas por el citoplasma, son activamente fagocíticas y de una vida media de tres días. Por último los monocitos originan los macrófagos tisulares (higado y cavidad peritoneal), miden de 20 a 80 micras de diámetro y contienen uno o más núcleos vesiculares y numerosos corpúsculos de inclusión o granulos citoplasmicos de gran tamaño.

Los macrófagos tisulares parecen capaces de vivir largo tiempo, hasta varios años, pudiendo replicarse o permanecer latentes (5).

En la otra rama de diferenciación el mieloblasto puede dar lugar a promielocitos neutrófilos, promielocitos eosinófilos y promielocitos basófilos (Fig. 1), cada uno de ellos se diferenciará en formas distintas de granulocitos, a saber, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. El desarrollo de las series neutrófilas, normalmente solo tiene lugar en la médula ósea, los mieloblastos originan el promielocito que presenta una gran acumulación de granulos azurófilos en su citoplasma basófilo, al igual que en el mieloblasto, existen aquí un gran núcleo ovalado con uno o más nucleolos prominentes, también presenta un aparato de golgi desarrollado y un retículo granular extenso con polirribosomas

libres, con la maduración desaparecen los nucleolos, el cociente núcleo-citoplasma se reduce a la vez que se reduce el tamaño celular, posteriormente el aparato de golgi se atrofia y cesa la granulogénesis. Las formas maduras del granulocito son las células multilobuladas (generalmente de 3 a 4 lóbulos) y las células en banda (cayados) (6).

Los neutrófilos pueden aparecer libres en la circulación de la sangre o adheridas a las paredes de los vasos sanguíneos, estos últimos constituyen la reserva de granulocitos en circulación, normalmente el tiempo de vida medio del granulocito neutrófilo maduro es corto, tres días desde que llega a la circulación procedente de la reserva de la médula ósea.

Estas células emigran, atravesando el endotelio vascular, a los espacios tisulares y raras veces, o nunca, retornan al sistema circulatorio. Su vida finaliza allí siendo eliminadas por los macrófagos (Fig. 2).

2.2.- CARACTERISTICAS FUNCIONALES.

La base de la defensa del huésped frente a infecciones por microorganismos invasores está constituida por los fagocitos, dentro de los cuales están incluidos los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los fagocitos macrófagos. Estas células eliminan a los microorganismos invasores mediante toda una serie de mecanismos microbicidas que se ponen en marcha una vez que estos han sido ingeridos.

El proceso de fagocitosis comprende una serie ininterrumpida de pasos que permiten que esta función

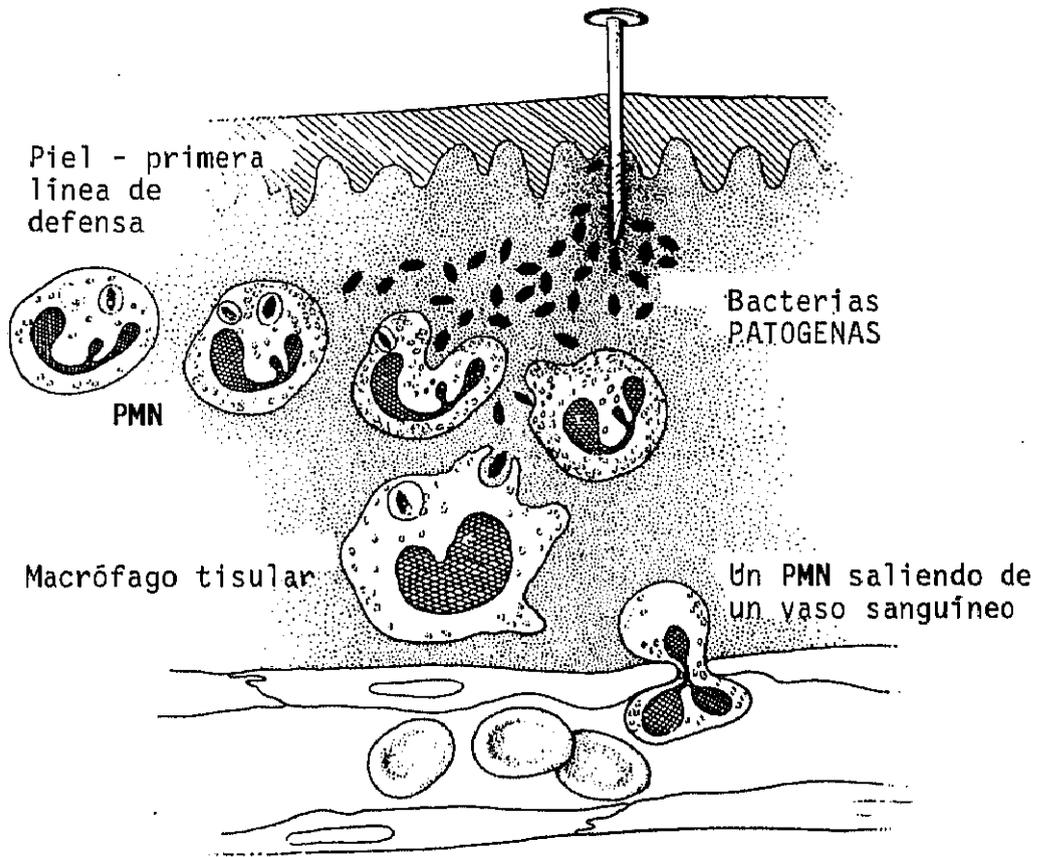


Figura 2. Esquema de la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos tisulares, después de que las bacterias patógenas han atravesado la piel y han invadido tejidos profundos. Los PMN llevan a cabo una fagocitosis más eficaz que los macrófagos, pero estos últimos constituyen la etapa previa para el desencadenamiento de respuestas inmunes específicas.

pueda ser llevada a buen termino: Adhesividad, quimiotaxis, fagocitosis y actividad microbicida.

Adhesividad. Los leucocitos tienen la capacidad de adherirse al endotelio vascular, principalmente en las venulas postcapilares, como primer paso en la respuesta inflamatoria (7) y dependiente de glicoproteínas situadas en la membrana de los leucocitos (8). Aunque el mecanismo exacto de regulación no está muy claro, intervienen diversos factores como la fibronectina, los péptidos formilados, el factor C5a del complemento, agentes relacionados con el proceso inflamatorio, nucleótidos cíclicos, cationes divalentes, etc.. (7, 9, 10, 11).

Quimiotaxis. Los PMN y los macrófagos poseen la capacidad de emigrar a través de los tejidos, esta emigración puede ser al azar o dirigida específicamente mediante un estímulo químico inflamatorio, este proceso es la quimiotaxis. Estos leucocitos contienen en su superficie y secretan enzimas proteolíticas que son activadas a pH tisular y que cumple un papel transcendental en su capacidad de emigrar. Muchas sustancias generadas durante la inflamación tienen la propiedad de incrementar la velocidad de emigración (quimioquinesis) y orientar el movimiento en la dirección de un gradiente aumentando la concentración del agente (quimiotaxis):

- Productos bacterianos que inducen quimiotaxis en leucocitos como las endotoxinas y péptidos N-formilmetionínicos (12, 13).

- Factores derivados del suero como la anafilotoxina C5a y complejos antígeno-anticuerpo (14, 15).

- Derivados del ácido araquidónico. Entre ellos se encuentran la prostaglandina E₁, los derivados monohidroxilados del ácido araquidónico y los leucotrienos como el B₄ (LTB₄) (16).
- Compuestos de linfocitos T y B estimulados que pueden atraer a los macrófagos en los sitios de inflamación y retardan las reacciones de hipersensibilidad (17).
- Factores producidos por las células mononucleares pueden estimular la quimiotaxis en neutrófilos (18).

Existen sustancias en los sitios de inflamación que inhiben la migración al azar de estas células evitando que escapen de las zonas dañadas, así, están las linfoquinas como el factor inhibidor de migración de macrófagos, enzimas proteolíticas producidas durante la activación del complemento como el factor Bb, la plasmina, el plasminógeno así como su factor activador (11,19,20,21).

Todas estas sustancias quimiotácticas tienen la propiedad de actuar a distancia mediante su interacción con ciertos receptores que se encuentran en las membranas de las células fagocíticas (16, 22, 23). Se ha observado que para la transducción de la señal para la quimiotaxis se requiere de reacciones de transmetilación mediadas por S-adenosin metionina que son dirigidas hacia la activación de fosfolípidos de membrana (24). Recientes evidencias sugieren que la proteína kinasa C también está involucrada en la transducción de algunas señales inducidas por quimioatrayentes (25). Se sabe también que en la membrana plasmática existen esterasas que están relacionadas con este proceso (26), en él también

se producen fenómenos de despolarización y posterior carga de la superficie de la membrana plasmática del fagocito (16), también se requiere de cationes divalentes calcio y magnesio (27, 28) así como de nucleótidos cíclicos AMP_c y GMP_c (29, 30).

Los leucocitos se mueven sobre la superficie mediante la emisión de unas protuberancias planas y delgadas, los pseudópodos, a la vez en la parte posterior del leucocito se formará una cola de retracción también llamada urópodo. Los pseudópodos a nivel estructural contienen microfilamentos que representan la parte contractil del citoesqueleto, constituidos por actina y miosina entre otras proteínas (31), la transición de actina en su forma globular a fibrina, constituye la base de la clásica transición sol-gel del citoplasma de las células en movimiento (32).

Se sabe que los agentes quimiotácticos pueden estimular el ensamblaje de los microtubulos, responsables del mantenimiento de la forma celular, de la polaridad del movimiento así como aumentar el GMP_c (33,34) de este modo la polimerización de la tubulina sería paralela a la dirección de migración produciendose al mismo tiempo un acortamiento de los microtubulos en direcciones perpendiculares a esta (35). El papel que desempeñan los microtubulos ha sido puesta en evidencia con diversos tratamientos con colchicina, esta droga inhibe el auto-ensamblaje de la tubulina y produce una alteración de la dirección de desplazamiento así como una perdida de respuesta a estímulos quimiotacticos aumentando su movimiento al azar (36).

Fagocitosis

Este proceso podemos dividirlo en dos etapas: reconocimiento e ingestión. Para que una partícula pueda ser ingerida ha de unirse a determinadas áreas de la membrana del fagocito; dependiendo de las características de tamaño y forma de la superficie de la partícula, este material particulado puede ser desde complejos antígeno-anticuerpo y componentes celulares hasta partículas virales y células intactas en el caso de macrófagos. Una vez que se producen las interacciones con un receptor de superficie del fagocito se transmite una señal de forma desconocida dando lugar a la ingestión de la partícula (37). El reconocimiento del microorganismo o partículas extrañas va a estar mediado por componentes del complemento (C3b y C5) y anticuerpos (IgG e IgM) que se unen a este facilitando su interacción con el fagocito, este proceso se conoce con el nombre de opsonización.

En la membrana del macrófago se han encontrado toda una serie de receptores relacionados con este proceso:

- Receptores para las regiones Fc de las inmunoglobulinas. Así están los receptores FcRI que reconocen el isotipo γ_2a de las IgG, este se encarga de aumentar la actividad de la fosfolipasa A2, la cual está relacionada con el mecanismo en cascada del ácido araquidónico. Los receptores FcII, que reconocen el isotipo γ_1 y γ_2b (38), se cree que su papel sea de mediador en la concentración intracelular del AMP_c (39). También existen evidencias que indican la existencia

de sitios de unión específicos para el isotipo Y3 del IgG y del IgE (40).

- Receptores para el complemento. Son CRI y CR3 (41), estos pueden reconocer distintas porciones de la molécula C3 pero han sido mejor observados en su interacción con C3b y C3bi. Se sabe que las partículas extrañas envueltas por C3b y C3bi son adheridas y posteriormente fagocitadas por macrófagos inflamatorios gracias a estos receptores. En fagocitos mononucleares también se han detectado receptores para la anafilotoxina C5a (42). El papel de este receptor es el de inducir la secreción de interleukina-1 e iniciar la quimiotaxis (43).

- Receptores para manosa-fucosa. Se ha descrito la capacidad del macrófago peritoneal para reconocer glicoproteínas que tienen como terminal manosa y N-acetilglucosamina o residuos de fucosa (44). Se desconoce la función exacta de estos receptores pero se cree que podría ser otra forma de interaccionar con determinados elementos microbianos en la fagocitosis.

En la membrana de los PMN también se han descrito receptores para la porción Fc de las IgG así como para el C3b del complemento (45).

La internalización de las partículas es un proceso que requiere de una adherencia de los receptores del leucocito a los ligandos unidos a la partícula a modo de circunferencia, este es un proceso de "cremallera" también denominado zipper (46, 47). Si los ligandos no están en densidad suficiente para que ocurra este

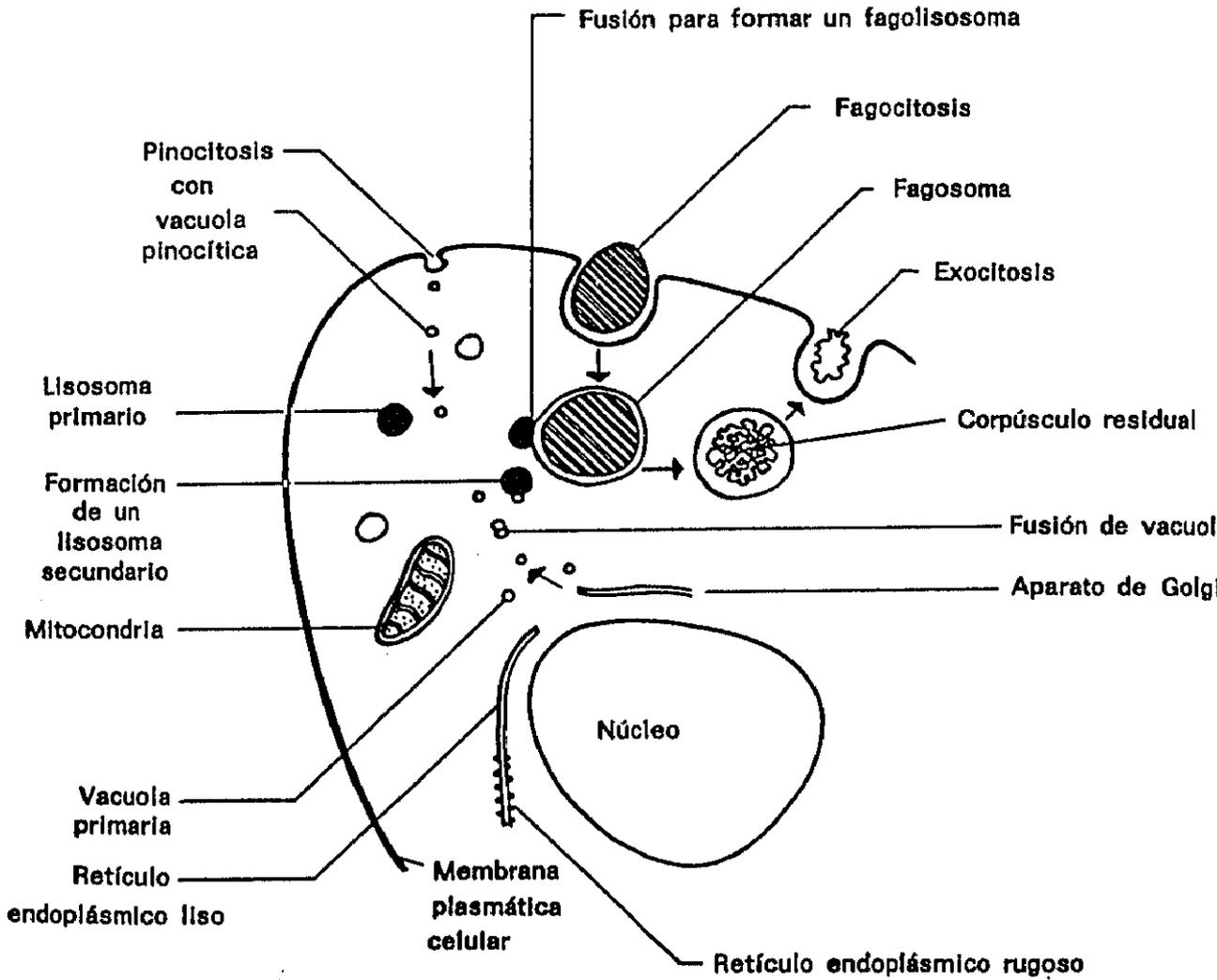


Figura 3. Representación esquemática de las estructuras vesiculares y granulares de un fagocito (tomadas de Alexander y Good, 1980).

fenómeno de reconocimiento o si los receptores de superficie no se mueven lo suficiente en la fase líquida de la membrana, este proceso se detiene en la fijación. Una vez formada en la periferia del leucocito las vesículas fagocíticas se dirigen hacia la zona perinuclear, guiadas por los microtúbulos en un proceso que requiere energía y que utiliza una gran cantidad de proteínas citoplásmicas contractiles (actina y miosina) (48). La ingestión es dependiente de los cationes divalentes (calcio y magnesio) y posiblemente del AMP_c, además de otros factores (37).

En la zona perinuclear, las vacuolas endocíticas se convierten en lisosomas secundarios después de su fusión con los lisosomas primarios, de forma alternativa, las vacuolas endocíticas o fagosomas pueden unirse con lisosomas secundarios preexistentes (Fig. 3). En algún momento entre la formación inicial de la membrana endosómica y la formación del lisosoma secundario, los contenidos empiezan a acidificarse y porciones de membrana, receptores citoplásmicos así como algunos de sus contenidos son devueltos a la superficie celular.

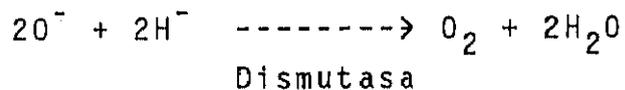
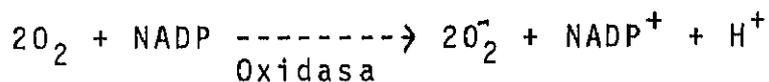
Dentro del lisosoma, los contenidos fagocitados así como algunas proteínas de la membrana plasmática son digeridos a pH ácido por más de 40 enzimas hidrolíticas (49). Las macromoléculas como proteínas, hidratos de carbono, complejos y lípidos son digeridos hasta ser reducidos a subunidades de pequeño peso molecular que pueden escapar del lisosoma hasta el citoplasma.

A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos pueden expulsar materias residuales no digeridas en virtud de un proceso llamado exocitosis.

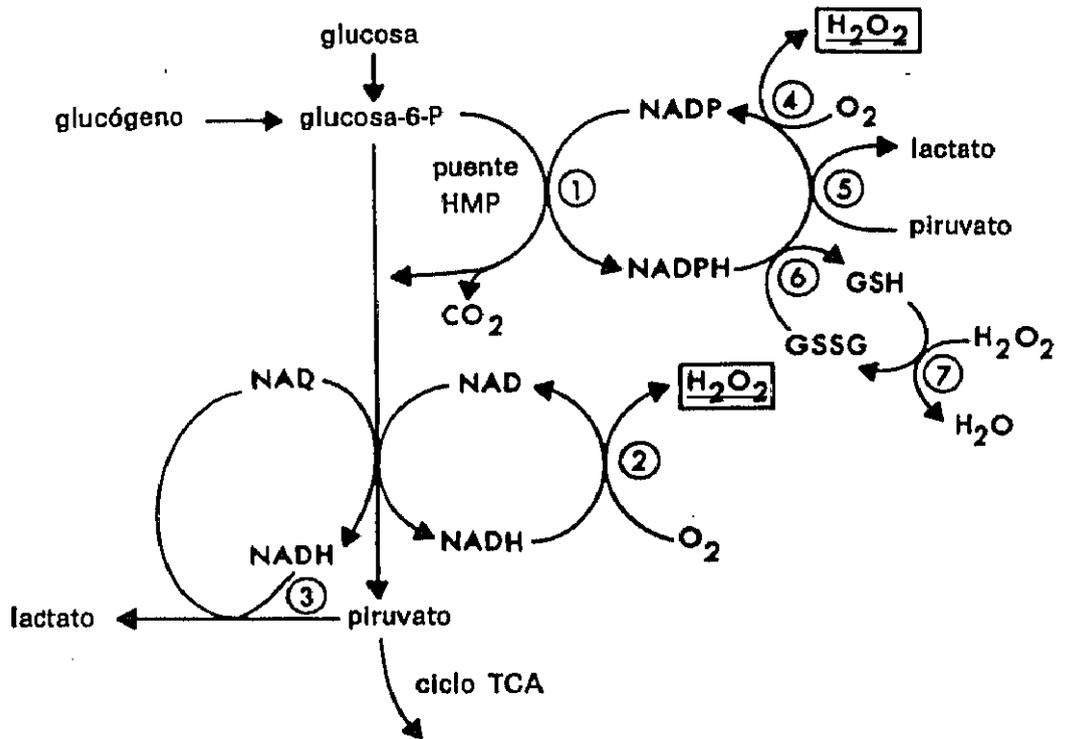
Los cambios metabólicos que acompañan a la fagocitosis son además de la liberación enzimática, un aumento de la glicolisis, una activación de la ruta de las pentosas, un aumento de la producción de agua oxigenada y del ión superóxido, así como la síntesis de lípidos, recambio del ARN y quimiluminiscencia (50,51).

El estallido respiratorio que se produce después de que la partícula ha sido ingerida por el fagocito produce un alto consumo de oxígeno, este, es reducido a superóxido en una reacción catalizada por una oxidasa asociada a la membrana y que es insensible a los inhibidores de la respiración mitocondrial, utiliza NADPH. La fuente de NADPH para la oxidasa la proporcionaría la ruta de las pentosas, esta oxidasa sería una flavoproteína que "in Vitro" podría utilizar tanto NADPH como NADH (52, 53, 54)(Fig. 4).

Con el estallido respiratorio la gran mayoría del oxígeno consumido se transformaría en superóxido por la oxidasa y luego por mediación de una dismutasa de superóxido se transformaría en agua oxigenada:



En este proceso está implicado un citocromo del tipo b (55). Tanto la flavoproteína como el citocromo forman parte de una cadena transportadora de electrones desde el NADPH al oxígeno (56). En todo este proceso se pueden formar radicales hidroxilo por la interacción

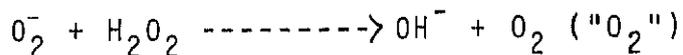


CLAVE DE ENZIMAS

- ① glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
- ② NADH oxidasa
- ③ deshidrogenasa láctica ligada a NADH
- ④ NADPH oxidasa
- ⑤ deshidrogenasa láctica ligada a NADPH
- ⑥ GSSG reductasa
- ⑦ GSH peroxidasa

Figura 4. Vias oxidativas del neutrófilo humano (tomada de Cline, 1975).

de los peróxidos de hidrógeno y los superóxidos:



Asimismo puede aparecer un estado excitado, los singletes de oxígeno pueden revertir a O_2 para generar luz (57) aunque esta luz podría proceder del superóxido o peróxido de hidrógeno (50).

Mecanismos microbicidas. Estos pueden ser divididos en oxígeno-dependientes y oxígeno-independientes:

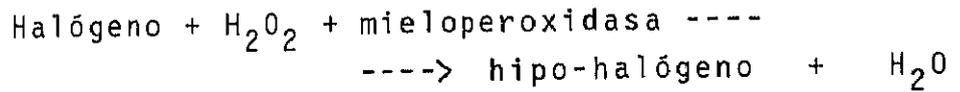
- Mecanismos oxígeno-dependientes.

1.- Mecanismos oxígeno-dependientes mieloperoxidasa independientes, cuentan con la acción microbicida de los derivados de la reducción del oxígeno molecular, el superóxido y el peróxido de hidrógeno así como la formación de radicales hidroxílicos (53, 58).

2.- Mecanismos oxígeno-dependientes mieloperoxidasa dependientes.

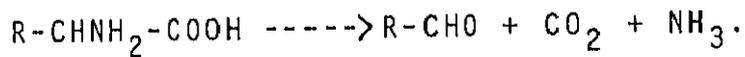
2.1.- Activación de halógenos. Los distintos halógenos intracelulares como el bromo y el yodo, pero especialmente el cloro y el yodo son activados por la presencia de agua oxigenada y mieloperoxidasa. Dicha enzima es una hemoproteína (59), se combina primero con el agua oxigenada formando un complejo enzima-sustrato que puede oxidar a una serie de componentes entre los que se encuentran los iones haluro, esta oxidación da lugar a un hipo-halógeno con un poder bactericida

muy acentuado (58). La reacción es:



En el caso del ión cloruro parece que el principal producto es el ión hipoclorito, muy tóxico. A partir de este producto se puede dar lugar a la formación de otros agentes oxidantes como los singletes de oxígeno y las cloraminas (60, 61).

2.2.- Descarboxilación de aminoácidos. La reacción básica es la siguiente:

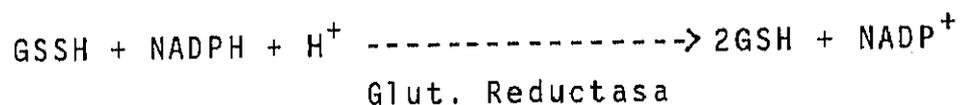
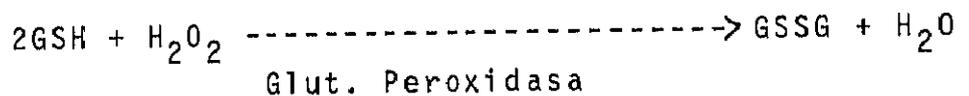


Esta reacción, controlada en parte por la mieloperoxidasa degrada muchos de los aminoácidos de la membrana bacteriana, lo cual da lugar a la muerte del germen (62).

Los fagocitos han de protegerse contra los radicales de oxígeno que son altamente tóxicos, así el ión superóxido es eliminado por la acción de la superóxido dismutasa, (ya vistas) que da lugar a la formación de agua oxigenada, esta a su vez es eliminada por dos sistemas (58), la catalasa que cataliza la reacción:



y el sistema glutatión peroxidasa - glutatión reductasa:



- Mecanismos oxígeno-independientes.

1.- Cambio de pH. El metabolismo anaerobico dentro del fagosoma lleva a la rapida producción de ácido láctico y ácido carbónico con lo cual el pH disminuye hasta cifras que fluctuan entre 6,5 y 4. Este es suficiente por sí solo para matar una serie de microorganismos como Streptococcus pyogenes o detener el crecimiento de otros como Escherichia coli (49).

2.- Liberación de lisozima. Esta enzima puede lisar bacterias rompiendo la unión entre el ácido murámico y la N-acetilglucosamina presente en muchos germenés gram-positivos (63).

3.- Lactoferrina. Esta proteina tiene capacidad de ligar ávidamente el hierro privando a las bacterias de este microelemento necesario para su normal metabolismo (64).

4.- Proteinas catiónicas. Son un conjunto de nueve proteinas de bajo peso moléculár, con grupos acídicos y que interfieren con el metabolismo de muchas bacterias impidiendo su crecimiento. Parece que el efecto de cada una de ellas puede ser diferente sobre distintos gérmenes y, en consecuencia, la carencia genética de una o varias de ellas puede asociarse con procesos infecciosos crónicos debidos a determinados microorganismos (65).

5.- Defensinas. Son moléculas peptídicas con actividad antimicrobiana muy variada (66).

3.- Características de los microorganismos seleccionados.

3.1.- Escherichia coli.

Son germenés gram-negativos, móviles y con forma bacilar, fueron aislados por Escherich en 1881. No forman esporas y son relativamente pequeños, pues miden de 2 a 3 μ de longitud y de 0,4 a 0,6 μ de anchura. Posee flagelos peritricos y fimbrias o pili especializados en la transferencia cromosómica durante la conjugación bacteriana. Algunas cepas son capaces de producir capsula formando grandes colonias mucoides, que pueden distinguirse fácilmente de la variedad lisa habitual no capsulada.

La pared de las bacterias gram-negativas está constituida, desde el exterior al interior, por una membrana externa, una capa de peptidoglicano, un espacio periplásmico y la membrana citoplásmica. La membrana externa hace posible que los bacilos resistan a los factores de defensa del huésped, como la lisozima o determinadas proteínas leucocitarias que suelen ser muy tóxicas para las bacterias gram-positivas, estas bacterias al ser huéspedes habituales del tubo digestivo, están protegidas contra su degradación por las sales biliares y por las enzimas digestivas.

Por otra parte, la membrana externa se comporta como una barrera de permeabilidad que protege a las bacterias contra ciertos antibióticos no difusibles y que por lo tanto, solamente son activos sobre gérmenes gram-positivos: Macrólidos, novobiocina, clindamicina,

ácido fúcsico (67).

La membrana externa está constituida por distintos elementos constitutivos (Fig. 5):

- Fosfolípidos. La composición en fosfolípidos es parecida a la de la membrana citoplasmica, conforman una capa bimolecular hidrófoba.

- Lipopolisacáridos. Abarcan tres regiones distintas: Las cadenas laterales o secuencias poliosídicas, que transportan las especificidades O, el "core" o nucleo de polisacárido de base, y el lípido A unido al "core" por un trisacárido. Las moléculas de lipopolisacárido (LPS) están constituidas por 6 o 7 ácidos grasos saturados, unidos a las glucosaminas del disacárido; es la fracción poliosídica de los LPS de las cepas lisas la que lleva consigo las especificidades O de las bacterias de las que proviene. Los LPS unidos entre ellos por iones Mg^{++} , lo que asegura, de esta manera, la estabilidad del conjunto. Los LPS o endotoxinas son los responsables del "shock" por bacilos gram-negativos, cuando tiene lugar la lisis bacteriana en la circulación sanguínea.

- Proteínas. Existe una gran cantidad de proteínas diferentes, entre ellas los poros y la proteína OmpA. La lipoproteína mureina asegura la estabilidad del conjunto de la membrana externa con el peptidoglicano, los poros son canales proteicos llenos de agua, que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrófilas a través de la membrana externa fosfolipídica, tiene un papel de difusión de

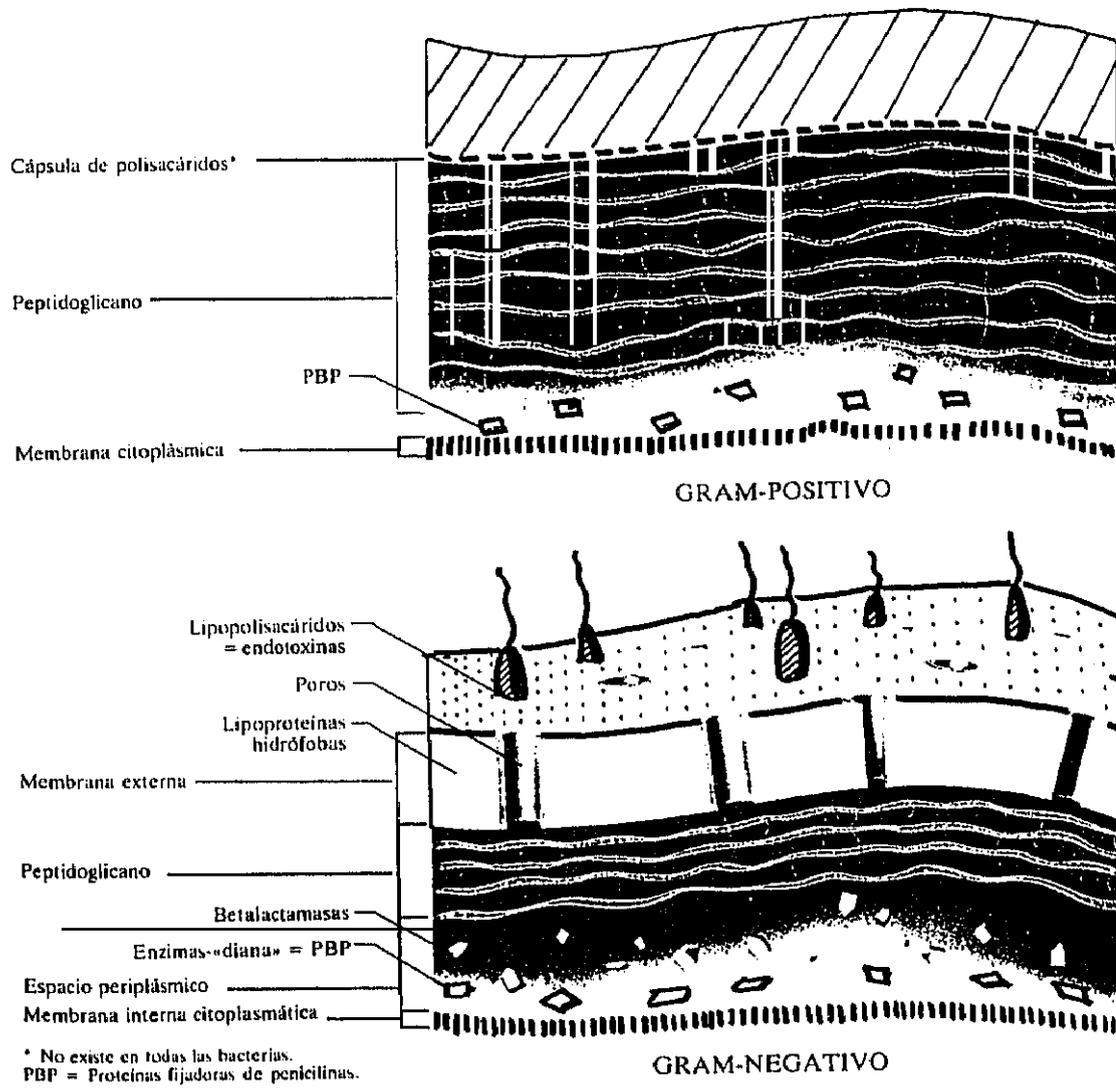


Figura 5. Estructura de la pared bacteriana (tomada de Bingen, 1987).

nutrientes (68). Existe una interacción entre los poros y los LPS, puesto que estos últimos determinan la orientación y la exposición de los primeros a la superficie bacteriana. La característica funcional de la membrana externa es la barrera hidrófoba, que permite el paso de las moléculas nutritivas esenciales, pero impidiendo al mismo tiempo, la penetración al interior de moléculas mayores, como las enzimas o determinados antibióticos, así como la salida de enzimas periplásmicas.

El peptidoglicano es un polímero compuesto de cadenas lineales de N-acetil-D-glucosamina y de ácido N-acetil murámico. Estas cadenas poliosídicas están unidas entre sí por cadenas cortas de tetrapéptidos que contienen L-alanina, ácido D-glutámico, L-lisina y D-alanina. Estos tetrapéptidos están unidos por una de sus extremidades al ácido N-acetil murámico y por la otra a otro tetrapéptido, bien directamente, bien por medio de aminoácidos suplementarios (pentaglicina). En la síntesis del peptidoglicano tres enzimas esenciales; una transglicolasa que asegura la formación de las cadenas de polisacáridos entre sí y la carboxipeptidasa que interviene cortando el puente entre los dos péptidos del dipéptido de alanina, impidiendo por ello la transpeptidación, de este modo la carboxipeptidasa tendría un papel en la regulación de la síntesis y, por lo tanto, en el grosor del peptidoglicano (69).

Los betalactámicos actúan inhibiendo las transpeptidasas y las carboxipeptidasas, gracias a su analogía de estructura entre el núcleo betalactámico y el dipeptido de alanina.

La unión de estos betalactámicos o proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) es la responsable de la inhibición de la síntesis de peptidoglicano y de la detención del crecimiento bacteriano.

El espacio periplásmico situado entre la membrana externa y la membrana citoplásmica, es donde se encuentran las enzimas capaces de hidrolizar los betalactámicos; las betalactamasas.

La membrana plasmática está constituida por una doble capa de fosfolípidos cuya permeabilidad (muy limitada para las moléculas polares) está influida por la variación de longitud y por el grado de saturación de los ácidos grasos que la componen. Ciertas proteínas que "flotan" en la masa de los fosfolípidos son permeasas que facilitan la difusión y el transporte activo a través de la membrana. Las PBP están insertadas en la membrana citoplásmica por su extremidad COOH, estando, igualmente, proyectado hacia el substrato su lugar enzimático activo (70).

Con respecto a la virulencia y el poder patógeno de E. coli el más importante constituyente de la pared celular son los lipopolisacáridos (LPS), estos no solo son los antígenos predominantes sino que además media un gran número de actividades biológicas (71), serológicamente son conocidos como antígenos O y farmacológicamente como endotoxinas. El lipopolisacárido puede extraerse de la pared bacteriana por tratamiento con fenol y por hidrólisis ácida suave, se obtiene una fracción lipoidea no inmunogénica (lipido A) que contiene los grupos químicos responsables de la toxicidad y una fracción con los antígenos O.

Algunos de los efectos que pueden provocar los lipidos A en una infección son pirogenicidad, neutropenia, activación de los macrófagos, del complemento, inducción y promoción del número de mediadores de la inflamación. La parte polisacarida está formada por unidades repetidas de oligosacaridos (72) y desempeña un papel importante en la virulencia y patogeneidad de E. coli. Ciertas cepas posee envueltas capsulares de polisacáridos, son los antígenos K, la presencia de estos enmascara a menudo los grupos inmunologicamente activos de los antígenos O situados más profundamente, y puede proteger a la bacteria de la acción bactericida de los fagocitos y el complemento (73).

Las enfermedades causadas más frecuentemente por E. coli son las infecciones de las vías urinarias. Los organismos pasan posiblemente del tubo digestivo a las vías urinarias y riñones por vía hematógica, linfática y por vía ascendente. Cuando el número de bacterias en orina es superior a 100.000 Ufc/ cm³, existe infección urinaria. Frecuente en niños, mujeres embarazadas y pacientes con lesiones obstructivas, y enfermedades neurológicas que afectan a las vías urinarias. Actúan como factores desencadenantes la ceterización y otras formas de instrumentación uretral.

3.2.- Staphylococcus aureus.

Son gérmenes esféricos gram-positivos que crecen agrupándose en racimos (griego, staphyle "racimo de uvas"). Roberto Koch en 1878 fué el primero en describir el estafilococo en pus humano. Más tarde en 1884, Rosenbach describió dos especies: Staphylococcus

(pyogenes) aureus y Staphylococcus (pyogenes) albus, actualmente clasificados en dos géneros diferentes (Staphylococcus) de la familia Micrococcaceae. Julianelle, en 1930, introdujo la primera clasificación de los estafilococos basada en diferencias de estructura antigénica y en 1942, fisk desarrolló un método de tipado por bacteriófagos.

Los estafilococos son organismos inmóviles que no forman esporas. Sus diámetros varían entre 0,7 y las 1,2 μ , forman racimos por divisiones irregulares en dos planos perpendiculares. Esto es más evidente en medios sólidos, en los líquidos forman a menudo cadenas cortas de no más de 4 elementos.

S.aureus forma colonias amarillo-doradas, debido a un pigmento amarillo formado por 2 carotenoides, el delta-caroteno y la rubixantina. Todas las cepas patógenas elaboran una enzima denominada coagulasa que coagula el plasma.

La pared de las gram-positivas, relativamente gruesa, está constituida en su mayor parte por el peptidoglicano (Fig. 5). Pueden estar presentes otros elementos constitutivos en situación superficial, especialmente los ácidos teicoicos, polisacáridos unidos de manera covalente a las cadenas de polisacáridos del peptidoglicano. La cápsula externa de polisacáridos, factor de virulencia, constituye un elemento inconstante en S. aureus (74).

Los factores de virulencia y toxinas de S. aureus son varios (75). Los estafilococos patógenos cuando crecen en medios artificiales liberan diferentes toxinas.

Las más elaboradas frecuentemente incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma, lambda), una leucocidina no hemolítica (produce degranulación de los leucocitos) y toda una serie de toxinas pirogénicas (exotoxina A y B, enterotoxina y TSST-1). Producen así mismo enzimas extracelulares (coagulasa y estafiloquinasa). También poseen diferentes antígenos de superficie como los de capsula (ácido glucosaminurónico), polisacárido A, un ácido glicerolteicoico, una proteína antigenicamente común para S. aureus y S. albus y por último la proteína A; esta interacciona de forma no específica con la porción Fc de las inmunoglobulinas, esta proteína es importante como factor de virulencia e "in Vivo" puede tener una gran variedad de efectos: activación del complemento tanto por vía alternativa como por la clásica con la generación de agentes quimiotácticos, inhibición de la actividad opsonizante de los anticuerpos por competición con los receptores Fc de los fagocitos, impidiendo su posterior fagocitosis, inducción de la liberación de histamina por leucocitos y proliferación de linfocitos B.

Es necesario resaltar la capacidad de S. aureus para sobrevivir en el interior de los fagocitos (76), capacidad muchas veces responsable de la patogenicidad de este microorganismo.

En las infecciones causadas por S. aureus juega aquí un papel importante la mutación como forma de resistencia a los antibióticos, esto plantea un grave problema en la clínica, ya que la efectividad de un nuevo fármaco va disminuyendo gradualmente cuando van apareciendo nuevas cepas de S. aureus.

La infección estafilocócica aparece a menudo como complicación de traumas accidentales y postoperatorios, de quemaduras y otras lesiones importantes de la piel y de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus y la cirrosis hepática. Es muy frecuente la infección de la piel, vías respiratorias y tubo digestivo, la penetración profunda en los tejidos provoca la multiplicación de S. aureus ocasionando a menudo necrosis y abscesos localizados. Así también pueden ocasionar ostiomielitis y endocarditis. Solo en infecciones más graves los microorganismos penetran a través de las barreras locales de la lesión e invaden los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo.

El hombre posee un alto grado de resistencia natural frente al estafilococo y además tiene en el suero, formados como resultado de pequeñas infecciones estafilocócicas de la piel y las mucosas, anticuerpos específicos; pese a todo, se puede alcanzar una estafilococia generalizada si las defensas bacterianas se hallan deprimidas (77).

3.3.- Candida albicans

El tratado de Lodder y Kreger de 1952 estableció las bases para la taxonomía de C. albicans. Presenta un crecimiento dimórfico, en la superficie de los medios sólidos ricos crece como levaduras gemantes ovales con un diámetro de 3 a 5 μ aproximadamente (en ocasiones, las levaduras y su progenie se adhieren entre sí para formar cadenas o pseudohifas) cuando lo hacen en profundidad en el medio pueden formar hifas, con una estructura tubular ramificada, de unos 2 a 10 μ de

diámetro y en los tejidos infectados pueden encontrarse ambas formas. Citológicamente son eucarióticas, posee varios cromosomas diferentes y una membrana nuclear perfectamente definida, así como mitocondrias y un retículo endoplásmico. Sus membranas contienen esteroides, por lo que se asemejan a la de los organismos superiores más que a la de las bacterias. La pared celular a semejanza de la de las bacterias recubre la parte externa de la membrana citoplásmica, la pared celular posee una estructura de aspecto embardado. La estructura fundamental de la pared está formada por un 2% de lípidos, un 3 - 6% de proteínas, un 0,6 - 2,7% de quitina, un 20% de manoproteínas (que contienen los determinantes antigénicos que determinan los serotipos A y B de C. albicans) y un 48 - 60% de polímeros de hexosas (glucanos) que constituyen el principal componente de la pared (78). La cantidad de estos dos últimos componentes no varía mucho con la fase de crecimiento pero la quitina se incrementa 4 veces con la formación de los tubos de germinación.

C. albicans secreta toda una serie de enzimas como la fosfatasa ácida, una fosfolipasa, una B-glucanasa (estrechamente relacionada con la morfogénesis, intercambio entre célula-pared y regulación en la estructura de los glucanos), y proteinasas ácidas estrechamente relacionadas con la patogenicidad de C. albicans (78).

Recientemente se han descubierto receptores para la fracción C3b del complemento en la superficie de C. albicans, que son específicos, saturables, reversibles y cuya función sería la de inhibir su fagocitosis por los leucocitos (79).

C. albicans se encuentra presente con frecuencia en las mucosas normales de la boca, vagina y tubo digestivo. No suele ser patógeno para el hombre sano pero puede actuar como tal en personas afectadas por otras enfermedades (p. ej; linfomas malignos, diabetes graves, sida etc..) y los individuos que han sido intensamente tratados con medicamentos antibacterianos o tratamientos inmunosupresores, cuando se hacen invasoras por estas circunstancias pueden producir diferentes tipos de lesiones, agudas o crónicas, más o menos diseminadas.

La **candidiasis oral** consiste en unas placas blancas en las mucosas de la boca y faringe, están compuestas por hifas y levaduras, suele darse en recién nacidos infectados durante el parto y en pacientes en estadio terminal de enfermedades caquetizantes como por ejemplo la carcinomatosis. Otra es la que afecta a la mucosa vaginal, **candidiasis vulvovaginal**. La invasión de los tejidos bronquiales y pulmonares es en general consecuencia de la obstrucción bronquial crónica, por ejemplo el carcinoma bronquial.

La **candidiasis intertriginosa** afecta en aquellas áreas de la piel que están permanentemente húmedas y maceradas. La **endocarditis** producida por C. albicans es poco frecuente, pero puede observarse en ciertas ocasiones en individuos adictos al consumo de drogas.

La principal línea de defensa frente a la candidiasis es la inmunidad celular. C. albicans no es lisado directamente por los anticuerpos y el complemento, así ambas más bien favorecen la fagocitosis de estos hongos por los neutrófilos, monocitos y macrófagos (80).

Una forma de evitar la muerte intracelular es su habilidad de formar tubos de germinación en el interior de las células fagocíticas, también la formación de hifas dificultan enormemente su fagocitosis y le permite penetrar en los tejidos más fácilmente que como levaduras (78).

4.- EFEECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS CELULAS FAGOCÍTICAS:

El que una enfermedad infecciosa pueda prosperar depende en gran medida de la capacidad de las células fagocíticas para ingerir y destruir los microorganismos patógenos, así como de una quimioterapia adecuada; esto hace que sea necesario conocer las interacciones que se establecen entre microorganismos, células fagocíticas y antimicrobianos (81).

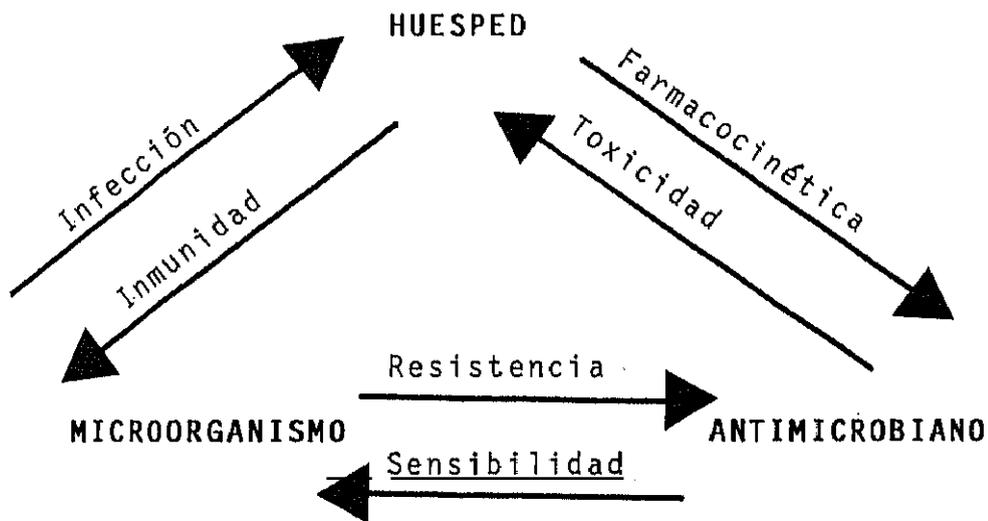


Figura 6. Triángulo de Davis y cols.

Se sabe que los antimicrobianos pueden modificar la acción de las células fagocíticas de varias formas:

a/- Pueden inducir neutropenia. Este efecto es conocido desde hace tiempo, los casos de mayor gravedad se han descrito con la administración de cloranfenicol.

(82). Este antibiótico puede producir una grave aplasia medular, suele ir acompañada generalmente de una detención en el proceso de maduración de la médula ósea. Otros casos menores se han descrito con gentamicina (83), estreptomina (84), rinfampicina (85), sulfamidas (86), y β -lactámicos (87). En derivados penicilínicos se han descrito en relación con penicilina G (87), carbenicilina (88), cloxacilina (89), piperacilina (90), nafcilina (90), oxacilina (91) y meticilina (92).

El mecanismo de producción de neutropenia por antibióticos no está muy claro (93), así por ejemplo, parece que en el caso del cloranfenicol, sulfacotrinoxazol y rinfampicina se produce una toxicidad directa sobre los precursores mieloides (94). Sin embargo en los producidos por antibióticos β -lactámicos el mecanismo parece inmunológico (95).

b/- Pueden atravesar la membrana celular y actuar en el interior de la célula frente a los microorganismos fagocitados si no se inactivan en su interior. Los fagocitos pueden proporcionar una protección para algunos microorganismos frente a determinados antibióticos que no tienen una buena penetración intracelular o si la tienen, pueden quedar inactivados. Así por ejemplo se comprobó que en infecciones por Staphylococcus en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica no respondían al tratamiento con penicilina ni estreptomina debido a una dificultad de penetración por la pared celular (96). Mandell utilizando penicilina marcada con carbono 14 vió que la mayor parte del isótopo permanecía en el exterior de los leucocitos polimorfonucleares y que Staphylococcus previamente fagocitados,

incorporaban mucho menos antibiótico que los que permanecían sin fagocitar (97).

Con otros β -lactámicos los resultados obtenidos son similares, lo que demuestra la baja penetrabilidad intracelular de este grupo de antibióticos (98).

En los aminoglicósidos, la gentamicina tiene muy poco poder de penetración (99) y la estreptomina solo es capaz de inhibir el crecimiento de Mycobacterium tuberculosis cuando se usan concentraciones 200 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria (100).

Otros antibióticos pueden penetrar fácilmente y ejercer su acción bactericida sobre los organismos fagocitados. Entre estos destacan: tetraciclina (101), cloranfenicol (102), etambutol, isoniazida, eritromicina, clindamicina y rifampicina (98, 102, 103), también los nuevos derivados quinoleínicos como ciprofloxacina y norfloxacina (104, 105).

El mecanismo de penetración de los antibióticos no es bien conocido en todos los casos. Puede realizarse por transporte pasivo del mismo fijado a la pared del microorganismo durante el proceso de fagocitosis, como sucede con penicilina y cefalosporinas (106). De esta forma el transporte es sólo de un 10%.

La acumulación de eritromicina y clindamicina en el interior de las células fagocíticas es rápida y se basa en que son sustancias básicas que tienden a pasar al medio intracelular, en virtud del gradiente establecido entre el pH extracelular y el de compartimientos celulares. En la captación de clindamicina

intervienen además un sistema de transporte activo a través de la membrana y se ha comprobado que su incorporación se inhibe competitivamente por nucleósidos (107).

Por último, los antibióticos con buena solubilidad en lípidos, como rifampicina y cloranfenicol, pasan en virtud de sus propiedades fisico-químicas y no requieren consumo de energía (97).

c/- Efectos sobre las células fagocíticas de las bacterias expuestas a los antibióticos. En los últimos años se ha prestado considerable atención a la posibilidad de obtener efectos sinérgicos entre los mecanismos de defensa del huésped y los antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones por determinados microorganismos. Esto se basa en el hecho de que las bacterias expuestas por un breve período de tiempo con concentraciones de antibiótico próximas a la CMI pueden alterar su morfología, adherencia y características de crecimiento sin interferir seriamente en su viabilidad (108).

Estos cambios en la superficie bacteriana atenúan la patogenicidad de los microorganismos, al disminuir factores de virulencia y paralelamente favorecen el reconocimiento e ingestión de las bacterias por las células fagocíticas (108).

La previa incubación de Escherichia coli con concentraciones subinhibitorias de cefotaxima y ceftazidima consiguió promover la quimiotaxis (109, 110). Similarmente la incubación de E. coli y Staphylococcus con concentraciones subinhibitorias de penicilina (111)

y clindamicina (112), estimulan la fagocitosis y actividad bactericida de los PMN.

En 1979 Pruu1 y McDonald (113) demostraron que E. coli previamente tratado con una concentración sobre-inhibitoria de cloranfenicol (4xCMI) durante un corto periodo de tiempo (10 min.) era suficiente para aumentar su susceptibilidad a los mecanismos microbicidas de los PMN, denominaron a este fenómeno PALE (Postantibiotic Leukocyte Enhancement). Este efecto en fase postantibiótica se consiguió también con cortas exposiciones de Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa con penicilina G (114), aztreonam (115) y lomefloxacin (116).

Las alteraciones producidas por los antimicrobianos sobre los microorganismos no están muy claros, así p.e. se sabe que la previa incubación de Streptococcus con clindamicina modifica su superficie con pérdida de la proteína M produciendo un aumento de la fagocitosis y digestión del microorganismo por las células fagocíticas (117).

Es posible que el aumento de la susceptibilidad tras la exposición a los antibióticos como los betalactámicos sea debido a que debiliten o disminuyan el grosor de las paredes de las bacteria y permitan a los agentes bacteriolíticos acceder más fácilmente a la célula extraña. En este sentido algunas cefalosporinas reducen la formación de la cápsula de una cepa de Klebsiella pneumoniae y favorecen su ingestión (118).

La repercusión clínica de estos hallazgos no está totalmente comprobada, aunque es posible que estos

cambios en la superficie de las bacterias patógenas contribuyan a aumentar la eficacia de los mecanismos de defensa.

d/- Efecto directo de los antimicrobianos sobre las funciones de los fagocitos. Los antibióticos pueden actuar directamente sobre los fagocitos alterando sus principales funciones como son : quimiotaxis, fagocitosis y capacidad microbicida (119).

Este hecho tiene una gran trascendencia en el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos, estos presentan alteraciones tanto en la inmunidad humoral como en la celular y por tanto están más expuestos a las infecciones oportunistas (micóticas y bacterianas).

Muñoz y Geister (120) demostraron, en 1950, que las tetraciclinas inhibían la capacidad de fagocitar microorganismos de los PMN. Posteriormente, diferentes autores han comprobado que diversas formas de tetraciclinas tienen un efecto inhibitorio sobre la fagocitosis (121), la movilidad celular (122) y la capacidad microbicida (123), siendo este dosis dependiente. La validez de estos hallazgos "in vitro" se refuerza al comprobar en voluntarios, que la ingestión de tetraciclina produce en los leucocitos las mismas alteraciones que se han encontrado al incubar las células con antibióticos (124). El cloranfenicol inhibe el metabolismo intracelular por interferencia con la ruta de la hexosamonofosfato y también puede afectar a la movilidad de las células (125, 126).

Del mismo modo la eritromicina puede afectar a la capacidad migratoria de las células (122) y las

sulfamidas interfieren con la fagocitosis y la actividad microbici­da (127). Dentro de los farmacos bactericidas, la rifampicina puede interferir con la capacidad migratoria de las células (128), así como con la producción del anión superóxido y con la quimioluminiscencia de PMN (129). Otros estudios con ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina sobre PMN no han mostrado alteraciones funcionales. Existen estudios discordantes en relación con los efectos de aminoglicósidos y betalactámicos, así a modo de ejemplo mientras Ferrari y cols (130) demostraban que los aminoglicósidos, especialmente gentamicina, inhibían la actividad candidicida, otros investigadores obtuvieron una respuesta normal (121).

Esta variabilidad parece depender en gran parte del método empleado y las diversas características de los estudios. En la actualidad son valorables los estudios comparativos, que incluyen varios fármacos a diferentes concentraciones y utilizan métodos bien establecidos. Inicialmente se pensó que los betalactámicos tenían poca capacidad de afectar directamente a los leucocitos, sin embargo, también se han descrito alteraciones de la capacidad funcional de PMN con algunos antibióticos de este grupo. La cefoxitina y cefoperazona inhiben la movilidad celular y el efecto es dosis dependiente (131). La ampicilina y cefotaxima inhiben la fagocitosis (132) y la cefalotina la capacidad microbici­da (133). El mecanismo responsable de la acción de los antibióticos betalactámicos sobre los PMN no es conocido, pero parece estar en relación con su capacidad de fijarse a la membrana de la célula y modificar su superficie.

Muy poco se sabe sobre la interacción de los antifúngicos en las funciones de los leucocitos humanos. La anfotericina B es el único agente que ha sido bien estudiado sobre su interferencia con las funciones de los PMN aunque las conclusiones puedan ser dispares, así algunos investigadores encontraron un efecto inhibitor de la quimiotaxis y fagocitosis (134, 135) pero no de la muerte intracelular de Candida albicans a un 1 µg/ml (136). Otros encontraron una reducción significativa de la fagocitosis y muerte solo a concentraciones cercanas a 10 µg/ml, la anfotericina B también puede inhibir la quimiluminiscencia de los PMN (137). 5-fluorocitosina se ha descrito como un inhibidor de la quimiluminiscencia pero sin ningún efecto en la quimiotaxis (134). Dentro de los derivados imidazólicos, se ha descrito al ketoconazol como supresor de la quimiotaxis de células fagocíticas humanas (138) o sin efecto (139). Abruzzo y cols. (137, 140) encontraron que la quimiluminiscencia era reducida por ketoconazol, fluconazol e itraconazol. En un trabajo más reciente, Rollides y cols (141), encontraron un efecto inhibitor de la quimiotaxis, fagocitosis y metabolismo oxidativo de los PMN por anfotericina B a una concentración de 5 µg/ml mientras que ketoconazol potenciaba la quimiotaxis y la muerte intracelular a 5 µg/ml. La 5-fluorocitosina, fluconazol y cilofungina no afectaron a ninguna de las funciones de los PMN a concentraciones terapéuticas.

Todos estos estudios permiten conocer mejor las relaciones que se establecen entre las células y los antimicrobianos, teniendo en cuenta sus posibles efectos, en especial al tratar pacientes con alteraciones de los mecanismos de defensa.

5.- CARACTERISTICAS DE LOS ANTIMICROBIANOS SELECCIONADOS.

5.1.- Cefotaxima.

La cefotaxima es un antimicrobiano perteneciente al grupo de las cefalosporinas de la 3ª generación, son β -lactámicos, con un anillo betalactámico unido a otro de dihidrotiacina. Posee una cadena lateral de aminotiazol y otra de oxime (Fig. 7).

Mecanismo de acción. Actúan interfiriendo en la síntesis de la pared celular bacteriana y su lugar de acción son las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), estas proteínas están constituidas por las transpeptidasas y las carboxipeptidasas que están implicadas en la síntesis del peptidoglicano de la pared (70).

Espectro antimicrobiano. Se ha demostrado su actividad mediante pruebas "in Vitro" frente a los gérmenes: Staphylococcus, Streptococcus, (el Streptococcus faecalis es poco sensible) Streptococcus pneumoniae, E. coli, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter aerogenes, Serratia, Proteus, (indol positivos e indol negativos), Haemophilus influenzae, Neisserias, Clostridium, Salmonella, Shigella y Yersinia. Son resistentes: Enterococo, Listeria monocytogenes, Clostridium difficile, Legionella, Acinetobacter, Bacteroides fragilis y la mayoría de las especies del género Pseudomonas. Sus combinaciones con aminoglicósidos suelen ser sinérgicos y raramente antagónicas.

Resistencias. La resistencia a cefalosporinas puede ser o por β -lactamasas o por pérdida de permeabi-

lidad por porinas, dificultando así el paso del antibiótico a través de la pared bacteriana hasta los PBP, de todas formas en tratamientos con cefotaxima suelen ser raros los desarrollos de resistencias.

Farmacocinética. No es absorbible por vía oral, difunde bien en los tejidos pero penetra poco en el líquido cefalorraquídeo cuando las meninges no están inflamadas. La unión a proteínas puede alcanzar niveles del 40%, posee una vida media de 1 a 2,5 horas alcanzándose una concentración sérica máxima de 102 ug/ml por vía intravenosa y de 20,5 ug/ml por vía intramuscular. La excreción renal se realiza por filtración glomerular y secreción tubular.

La cefotaxima se metaboliza en el hígado, encontrándose desacetilcefotaxima con una actividad antibacteriana similar a la cefotaxima (142, 143, 144 y 145).

Indicaciones terapéuticas.

- Como terapia inicial en infecciones graves con compromiso vital (septicemias, neumonias, infecciones de heridas y tejidos).
- En infecciones urinarias complicadas producidas por bacterias multiresistentes.
- Tratamiento de infecciones severas localizadas (colagenitis, neumonias, pielonefritis) o generalizadas, producidas por bacterias resistentes a cefazolina y penicilinas semisintéticas.
- Infecciones severas en pacientes alérgicos a penicilinas.

- Meningitis por Haemophilus, Klebsiella y E.coli.
- Gonococia, incluidos los ocasionados por cepas productoras de β -lactamasa.

Reacciones adversas. Alergia a cefalosporinas.

5.2.- Netilmicina.

Es un aminoglicósido derivado de la sisomicina (un derivado N-etilsisomicina), se presenta como sulfato, sustancia estable e hidrosoluble (Fig. 7). Aminoazúcares unidos a hexosas.

Mecanismo de acción. Actúa al igual que los demás aminoglicósidos inhibiendo la síntesis proteica por interferencia con la actividad de los ribosomas. Su unión a uno o más lugares ribosómicos puede además de inhibir, provocar la síntesis de proteínas extrañas al producirse errores en la lectura del RNA mensajero. En altas concentraciones la netilmicina puede ocasionar alteraciones de la pared. Es bactericida muy activo en medios alcalinos y con menor actividad en condiciones anaerobias (146).

Espectro antimicrobiano.

- En bacterias gram-negativas. La netilmicina es activa frente a un amplio espectro de enterobacterias: E. coli, Enterobacter sp, Klebsiella sp, Proteus sp, Salmonella sp, Shigella sp, Serratia sp, Citrobacter sp y Yersinia sp. También es activa frente al meningococo, gonococo y Haemophilus influenzae. La netilmicina es menos activa contra Acinetobacter sp, Bacteroides

fragilis y otras bacterias anaerobias gram-negativas.

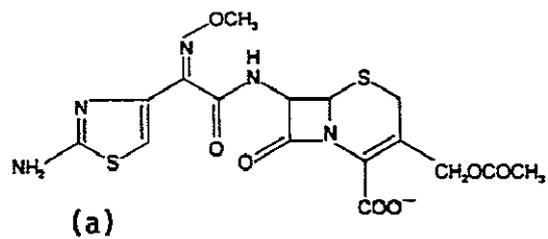
- En bacterias gram-positivas. Son sensibles la mayoría de las cepas de Staphylococcus aureus, S. epidermidis, con otros cocos gram-positivos como Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae y S. faecalis se crean resistencias.

Resistencias. Tiene una resistencia cruzada incompleta con gentamicina y parcial con amicacina (las cepas amicacin-resistentes son siempre resistentes a netilmicina pero nunca al contrario).

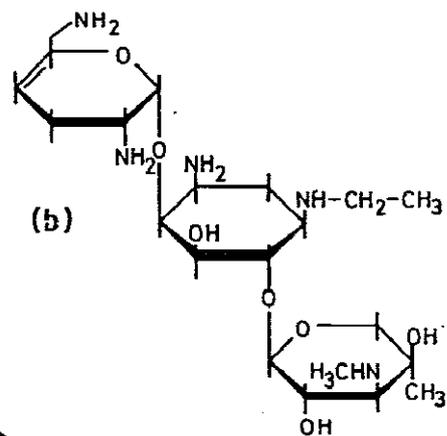
Los mecanismos de resistencia que pueden darse son dos:

- Por enzimas inactivantes o modificantes. En general todos los aminoglicósidos pueden ser modificados en su estructura por enzimas bacterianas como son acetiltransferasas, adeniltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas. Estas modificaciones los hacen ineficaces para inhibir la síntesis proteica bacteriana.

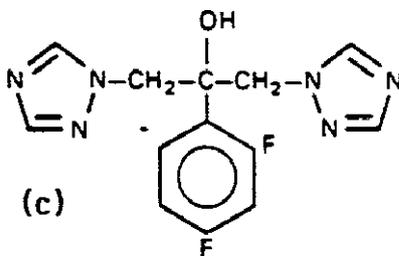
- Por impermeabilidad. Se produce por una disminución en la capacidad de penetración del antibiótico al interior de la bacteria, suele ser por mutación y consiste en un bloqueo por la proteína H1 de los puntos de unión a los aminoglicósidos existentes en la membrana externa. Esta proteína bloquea los puntos de unión de los cationes divalentes (calcio y magnesio), lugar de unión de los antibióticos catiónicos como polimixinas y aminoglicósidos.



CEFOTAXIMA



NETILMICINA



FLUCONAZOL

Figura 7. Estructura química de los antimicrobianos empleados: (a) cefotaxima; (b) netilmicina; (c) fluconazol.

Farmacocinética. La absorción oral de la netilmicina en nula, posee una vida media de 2,5 horas alcanzando unas concentraciones séricas máximas de 6 a 8 mg/l después de una inyección intravenosa de 2 mg/Kg de netilmicina, mientras que por inyección intramuscular a igual dosis se alcanzan niveles de 7,1 mg/l.

La combinación de la netilmicina con las proteínas plasmáticas es muy baja, del orden que va desde 0 hasta un 25%. Penetra poco en el líquido cefalorraquídeo, pulmón y circulación fetal. Al igual que los demás aminoglicosidos, la netilmicina se excreta por el riñón por filtración glomerular, siendo parcialmente reabsorbida por los tubulos. Se sabe que un 40% del aminoglicosido administrado en tratamiento a pacientes se deposita en los riñones, preferentemente en la corteza renal.

Indicaciones terapéuticas.

- Útil en infecciones producidas por Enterobacterias o Pseudomonas.
- En pacientes con infecciones urinarias, tracto biliar y gastrointestinal, peritonitis, infecciones pleuropulmonares, cutáneas, tejidos blandos, osteoarticulares, septicemia e infecciones en pacientes granulopénicos con cancer, causados por germen sensibles al antibiótico.

Reacciones adversas. Los dos efectos secundarios principales de la netilmicina son la ototoxicidad y la nefrotoxicidad. Se han descrito también un aumento de las transaminasas y de las fosfatasas alcalinas, hiperbilirrubinemia, trombocitosis, prolongación del

tiempo de protombina, exantema y fiebre medicamentosa (147).

5.3.- Fluconazol.

Es un antifúngico bis-triazólico. Difiere estructuralmente de los primeros antifúngicos azólicos en que el anillo imidazólico característico ha sido sustituido por un anillo triazólico, lo que ha supuesto la eliminación de un punto de degradación metabólica y le confiere una mayor especificidad frente a la enzima fúngica desmetilasa. Por otra parte, la introducción de un segundo grupo triazólico ha elevado su potencia y resistencia a la degradación metabólica. Estos cambios, unidos a las propiedades derivadas del radical sustituido del grupo fenil, han incrementado la polaridad del compuesto, dando como resultado una baja unión a proteínas plasmáticas (Fig.7).

Mecanismo de acción. El mecanismo principal parece ser la lesión de la membrana celular, aumento de la permeabilidad de la membrana y pérdida de elementos vitales, lo que provoca trastornos del metabolismo y muerte celular de los hongos. La clave de esta acción deleterea es la inhibición de la biosíntesis del ergosterol como consecuencia del bloqueo de la desmetilación del C-14 en el proceso de conversión de lanosterol en ergosterol, paso mediado por la enzima C-14 demetilasa, que es dependiente del citocromo P-450.(148).

Espectro antimicrobiano. Fluconazol ha demostrado ser un potente y eficaz antifúngico "in Vivo" frente

a un amplio espectro de hongos y levaduras, incluyendo Candida, Cryptococcus, Aspergillus y dermatofitos.

En pruebas con modelos animales de infecciones superficiales, como dermatofitosis y candidiasis vaginal, se ha comportado con una potencia de acción hasta 10 veces superior a la de ketoconazol. En la candidiasis sistémica el fluconazol ha resultado ser hasta 100 veces más activo que el ketoconazol y tener una potencia equivalente a la de anfotericina B y de 10 a 20 veces mayor que la de ketoconazol.

La actividad "in Vitro" de fluconazol frente a ciertos patógenos seleccionados no se corresponde con su actividad "in Vivo" en otros modelos de infecciones animales, así en un estudio de susceptibilidad con fluconazol comparado con ketoconazol, este último se mostró 16 veces más efectivo frente a distintas especies de Candida albicans "in Vitro" mientras que fluconazol fué 24 veces más efectivo "in Vivo" (149).

Resistencias. No se han detectado resistencias primarias aunque algunos estudios parecen indicar la existencia de resistencias cruzadas con otros antifúngicos triazólicos.

Farmacocinética. El fluconazol es soluble en agua, su unión a proteínas es muy baja proporcionando una alta biodisponibilidad, penetra bien en el fluido cerebro-espinal y se excreta en la orina en grandes concentraciones. Fluconazol es metabólicamente estable, y se puede recuperar más del 90% de la dosis en orina y heces.

La absorción después de una administración oral en voluntarios humanos es buena; se obtienen concentraciones relativas en plasma altas, p.e. después de suministrar 1 mg/Kg se obtiene 1,4 ug/ml. Los datos obtenidos por el estudio de la distribución del fármaco en el organismo indican que puede ser efectivo frente a infecciones ocasionadas en un variado número de órganos como el tracto gastrointestinal, el tracto urinario y el sistema nervioso central (150).

La mayor diferencia entre el fluconazol y los demás azoles está en su nivel de penetración en el fluido cerebro-espinal, se han alcanzado concentraciones del 60 al 80% de los niveles en suero.

Estudios con dosis múltiples de fluconazol (50 mg/día) han producido una pequeña acumulación de fármaco en el tiempo con unos picos de niveles en plasma de 1,05 2,21 2,37 y 2,62 ug/ml en los días 1, 7, 14, y 28 respectivamente (Pfizer Central Research Investigators Reference Manual, 1986). El tiempo de vida media en plasma de una sola dosis fué de 22h.

Indicaciones terapéuticas. Fluconazol está indicado en el tratamiento de las siguientes micosis: candidiasis, tanto localizadas (candidiasis orofaríngeas, esofágicas, candidiasis oral atrófica crónica, candidiasis vaginal) como las formas sistémicas o invasivas (candidemia, endocarditis por Candida, endoftalmitis por Candida, peritonitis por Candida...); en las criptocosis, tanto en su forma meníngea como en su forma pulmonar y otras diferentes localizaciones. Igualmente, está indicado en la profilaxis de infecciones fúngicas en aquellos pacientes especialmente predispuestos a padecer

estas infecciones (SIDA, pacientes oncológicos, pacientes trasplantados, etc.).

Reacciones adversas. No se conocen, fluconazol suele ser bien tolerado en dosis por encima de 400 mg/día, pueden darse algunos casos aislados de esfoliación de la piel y toxicidad hepática.

2.- OBJETIVOS

OBJETIVOS

Son muchos los estudios en los que se pone de manifiesto que los antimicrobianos no solo actúan sobre los microorganismos para los que son específicos, sino que además pueden interferir en la función microbicida de las células fagocíticas, actuando directamente sobre las funciones básicas del fagocito o bien induciendo cambios morfológicos y funcionales no letales en el microorganismo invasor, facilitando así su reconocimiento y fagocitosis por los leucocitos. Este último aspecto es determinante en aquellos antimicrobianos que tienen una mala penetración intracelular y su acción sobre el microorganismo termina cuando este último es fagocitado por el leucocito; muchos de estos pueden sobrevivir en su interior.

En nuestro trabajo hemos estudiado estos dos aspectos:

- En el estudio de la acción directa de los AM sobre los fagocitos se utilizó cefotaxima y netilmicina, dos antibióticos ampliamente utilizados en clínica con una discreta capacidad de penetración intracelular, como fagocito se escogió al macrófago por dos razones; la primera por su importante papel en la respuesta inmune específica (presentador de antígenos) y la segunda porque existen muchos trabajos con PMN y pocos con macrófagos.

Se valoraron las modificaciones producidas en las siguientes funciones celulares:

- Adherencia a placas MIF.

- Capacidad de movilidad.

Movilidad espontánea.

Quimiotaxis.

- Capacidad adherente.
- Capacidad de fagocitosis.

- En el estudio del efecto indirecto de los AM en la capacidad microbicida del leucocito se ensayó además de los dos antibióticos antes mencionados un nuevo antifúngico azólico; el fluconazol. Se incluyó debido a la importancia que han adquirido en los últimos tiempos las infecciones micóticas oportunistas especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Como leucocitos se escogieron los PMN (fagocitos profesionales) y como microorganismos un bacilo, un coco y un hongo; Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Candida albicans.

Se valoraron:

- CMI , CI₅₀ y CI₂₅.
- Curvas de letalidad.
- Cinéticas de crecimiento de los microorganismos previamente tratados con antimicrobiano.
- Susceptibilidad de los microorganismos previamente tratados con antimicrobiano a la acción microbicida de los leucocitos polimorfonucleares.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- MATERIAL.

Animales

Para la obtención de macrófagos hemos empleado ratones de la raza Balb/c tanto hembras como machos con 12 semanas y con un peso comprendido entre 19 y 21 g, suministrados por la casa Panlab S.A. de Barcelona.

Aqua

Se utilizó agua, desionizada y esterilizada en autoclave.

Solución salina tamponada con fosfato

La solución fisiológica utilizada tiene la siguiente composición por litro:

- ClNa 7,20 g.
- PO_4H_2K 0,44 g.
- PO_4HNa_2 1,54 g.

Solución salina

Se preparó disolviendo 9 g. de ClNa en un litro de agua destilada, esterilizando la disolución en autoclave y conservandola en nevera a 4°C.

Medio de cultivo para células

Se ha utilizado como medio de cultivo para PMN y macrófagos solución fisiologica de Hank's (HBSS),

preparado con la siguiente composición por litro:

- HBSS sin Ca^{++} , Mg^{++} ni NaHCO_3 .
 - ClNa 8 g.
 - KCl 0,4 g.
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,048 g.
 - KH_2PO_4 0,06 g.
 - Glucosa..... 1,0 g.

- Reactivos adicionales para HBSS completo.
 - CaCl_20,14 g.
 - NaHCO_3 0,35 g.
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,16 g.
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g.

Preparación de HBSS al 0,1% de gelatina

Un gramo de gelatina purificada (Sigma) se disuelve en 100 ml de agua destilada estéril y se calienta al baño maria para licuarla. Se guarda en nevera; a continuación a 90 ml de HBSS se le añade 10 ml de la gelatina para obtener HBSS con gelatina al 0,1%.

Solución isotónica de cloruro amónico

Se pesan:

- ClNH_4 4,16 g.
- NaHCO_3 0,42 g.

Todo se añade en agua destilada estéril hasta 500 ml.

Azul de tripano al 4%

Se pesan 4 gramos de colorante en polvo y se disuelven en 100 ml de agua destilada estéril.

Caldo de Müller-Hinton

Se disuelven 21 gramos de caldo Müller-Hinton (Oxoid) en un litro de agua estéril, se mezcla bien y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo de Triptona-Soja

Se disuelven 30 gramos de caldo Triptona-Soja (Oxoid) en un litro de agua estéril, se mezcla bien y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar de Müller-Hinton

Se suspenden 35 gramos de Müller-Hinton (Oxoid) en un litro de agua destilada estéril y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar de Triptona-Soja

Se suspenden 40 gramos de Triptona-Soja (Oxoid) en un litro de agua destilada estéril y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar de Sabouraud

Se suspenden 65 gramos de Sabouraud (Oxoid) en un litro de agua destilada estéril y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo de YNB (Yeast nitrogen base mediun) al 1% de glucosa en tampón fosfato.

Se prepara la siguiente composición:

- Medio YNB (Difco).....3,35 g.
- Glucosa.....5 g.
- Cloranfenicol.....0,2 g.
- Sulfato de gentamicina.....0,02 g.

A continuación se disuelve todo en 500 ml de tampón fosfato 0,01 M.

Aparatos.

- Nevera (Zanussi).
- Autoclave (Selecta Autester).
- Estufa (Selecta).
- Espectrofotómetro (Hitachi U-1100).
- Medidor de pH eléctrico (Giralt).
- Balanza de precisión (Precisa 80A - 200 M).
- Micropipetas fijas y regulables (Gilson).
- Microscopio óptico (Nikon SE).
- Agitador de tubos (Heidolph Reax 200).
- Centrifuga de precisión (Selecta Meditronic).
- Baño de agitación (Selecta Unitronic 3200 R).

Material de laboratorio.

- Cámaras de Boyden.
- Homocitometro de Neubauer.
- Placas MIF (Sterilin) para adherencia y fagocitosis.
- Filtros de esteres de celulosa (Millipore).
- Tubos de 5 ml con EDTA desechables (Labclinics).
- Tubos cónicos de 1,5 ml en polipropileno con tapón incorporado (Labclinics).

- Tubos con fondo cónico de 20 ml (Labclinics).
- Jeringas estériles de un solo uso (Soria Greiner).
- Puntas para micropipeta (Soria Greiner).
- Material fungible: Matraces, pipetas, probetas y tubos (Simax y Schott Mainz).

Reactivos.

- Alcohol etílico (Panreac).
- Alcohol metílico (Panreac).
- Alcohol propílico (Panreac).
- Xileno (Panreac).
- Caseína purificada (Sigma).
- Glucosa (Kodak).
- Cloruro amónico (Sigma).
- Cloruro magnésico (Panreac).
- Cloruro sódico (Panreac).
- Cloruro potásico (Panreac).
- Cloruro cálcico (Panreac).
- Fosfato magnésico (Panreac).
- Fosfato disódico (Sigma).
- Bicarbonato sódico (Panreac).
- Fosfato monopotásico (Panreac).
- Diff-Quick (Dade).
- Gelatina (Sigma).
- Azul de metileno (Panreac).
- Azul de tripano (Merk).

Esterilización

El material y los medios utilizados se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1,5 atmósferas de presión durante 15-20 minutos.

Obtención del suero.

El suero que se utilizó en los estudios de la fagocitosis se obtuvo de sangre venosa de un grupo de individuos sanos que se recogió en tubos de vidrio estériles. Se dejó coagular a temperatura ambiente y tras retirar el coágulo se centrifugó durante 20 minutos a 800 g.

Posteriormente se realizaron pools de los sueros de cada 10 donantes y se envasaron en alícuotas de 500 ul, congelándose a - 30°C. La cantidad que se iba a utilizar se descongelaba y se desechaba el volumen sobrante.

Microorganismos.

Para todo el estudio se utilizó Escherichia coli ATCC 25922 como gram- negativo, Staphylococcus aureus ATCC 25923 como gram- positivo y Candida albicans ATCC 10231 como hongo. Todos los microorganismos se cultivaron y se renovaron cada 72 horas en medio de Müeller-Hinton o Triptona-Soja en el caso de bacterias y medio Saboureaud para candidas.

Antimicrobianos.

Se utilizaron una cefalosporina de 3ª generación, cefotaxima (potencia de 928 mg/g, suministrado por Hoechst Iberica s.a.), un aminoglicósido, netilmicina (potencia de 586 mg/g, suministrado por Schering-Essex s.a.) y un derivado azólico, fluconazol (potencia 998 mg/g, suministrado por Pfizer, s.a.). Se prepararon muy concentrados en solución salina y se congelaron para su uso posterior.

Los reactivos empleados así como los aparatos utilizados en cada una de las técnicas realizadas serán especificadas durante la descripción de las mismas.

3.2.- METODOLOGÍA:

3.2.1.- EFECTO DIRECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS FUNCIONES IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS.

3.2.1.1.- Concentraciones de los antibióticos estudiados.

Para nuestro trabajo se utilizaron alícuotas (previamente preparadas) de cefotaxima y netilmicina concentradas en solución salina y se diluyeron en solución de Hanks (HBSS) hasta alcanzar las concentraciones requeridas (mayores, iguales o menores a la concentración terapéutica alcanzada en plasma).

Para cefotaxima las concentraciones fueron 1,2 12 60 y 120 mg/l y para netilmicina 0,5 2 8 y 32 mg/l.

3.2.1.2.- Obtención y recuento de los macrófagos.

Ratones de la raza Balb/c fueron anestesiados con eter (Analema) y seguidamente sacrificados por dislocación cervical. Una vez descubierto el peritoneo (sin abrirlo) se inyectaron 3 ml de HBSS a 4°C y a un pH entre 7,3 y 7,4 con agujas y jeringas esteriles (Fig. 8).

El abdomen se masajeó con suavidad durante un minuto y se extrajo la suspensión de macrófagos que después se colocó en tubos de plástico a 4°C de temperatura (151). El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer o hemocitómetro considerando:

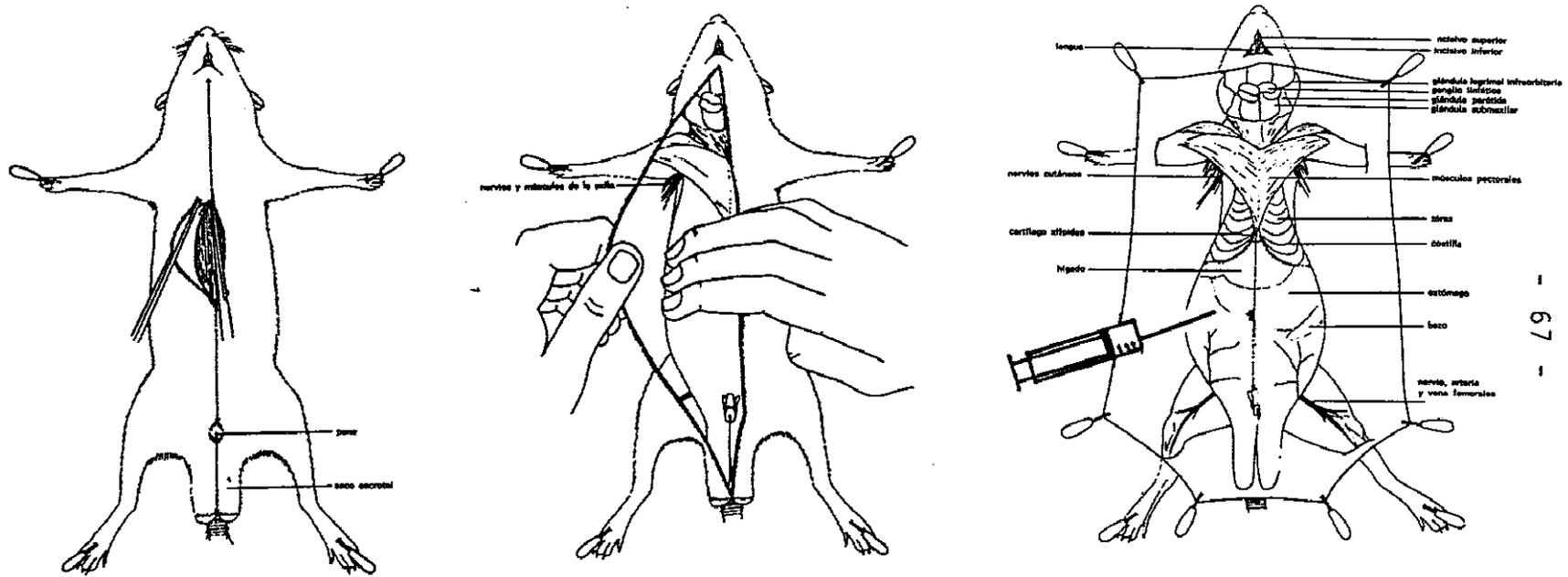


Figura 8. Obtención de macrófagos peritoneales murinos de ratones Balb/c.

a) El número de células morfológicamente compatibles con macrófagos, contadas en los 4 cuadrantes de la parte superior e inferior de la cámara. Para comprobar la fiabilidad a la hora de distinguir los distintos tipos celulares que se encuentran en el líquido peritoneal, se empleó el análisis citoquímico de las esterasas no específicas con α -nail-butirato, de acuerdo con el método de Koski (152). Según los resultados, al menos el 95% de las células obtenidas eran macrófagos, y el resto eran hematies y linfocitos.

b) La corrección del volumen se hizo considerando que cada cuadrante de la cámara tenía unas dimensiones de $1,0 \times 1,0 \times 0,1$ mm y por tanto un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$, al contar las células de los 4 cuadrantes, el volumen total es de $0,4 \text{ mm}^3$. Para conocer el número de macrófagos por cada mm^3 tuvimos que multiplicar 0,4 por 2,5 y así obtuvimos un volumen de 1 mm^3 . Por tanto el factor de corrección era de 2,5.

La viabilidad celular se estudió paralelamente con el colorante vital Azul de Tripano. Las células empleadas en los estudios tenían siempre una viabilidad superior al 85%.

3.2.1.3.- Adherencia.

El estudio del efecto de los antimicrobianos sobre la adherencia de los macrófagos peritoneales murinos (MPM) se realizó de la siguiente forma:

Se colocaron 100 μl de suspensión celular (1×10^6 macrófagos /ml) en las placas MIF (Sterilin). Se añaden entonces 100 μl del antibiótico concentrado al doble de las dosis a estudiar, remplazandose por HBSS en los pocillos controles.

Después de 30 minutos de incubación a 37°C con humedad, se agitan los sobrenadantes vigorosamente, procediéndose al recuento de los MPM no adheridos.

El índice de adherencia (I.A.) se calculó según la ecuación:

$$I.A. = \frac{M_i - M_f}{M_f} \times 100$$

en donde M_i = número de macrófagos iniciales y M_f el número de macrófagos en el sobrenadante.

3.2.1.4.- Estudio de la movilidad del macrófago.

- Preparación de la técnica.

Se empleó una modificación del método originalmente descrito por Boyden (14).

La cámara de polietileno (Mark-it-Engineering) (Fig. 9) consiste en dos compartimentos (a y c) separados por un filtro (b) cuyos poros tienen un tamaño tal que impiden la caída de las células por mera gravedad y solo pueden ser atravesados por los macrófagos por migración activa. Se emplearon del tipo Millipore M.F; de 3 μ m para la quimiotaxis (SS. WPO. 1300) y de 8 μ m para los estudios de movilidad espontánea (SC. WPO. 1300).

Después de montada la cámara, se selló con plastilina dejando libre el orificio del compartimento inferior (e) para poder proceder al llenado del mismo con una

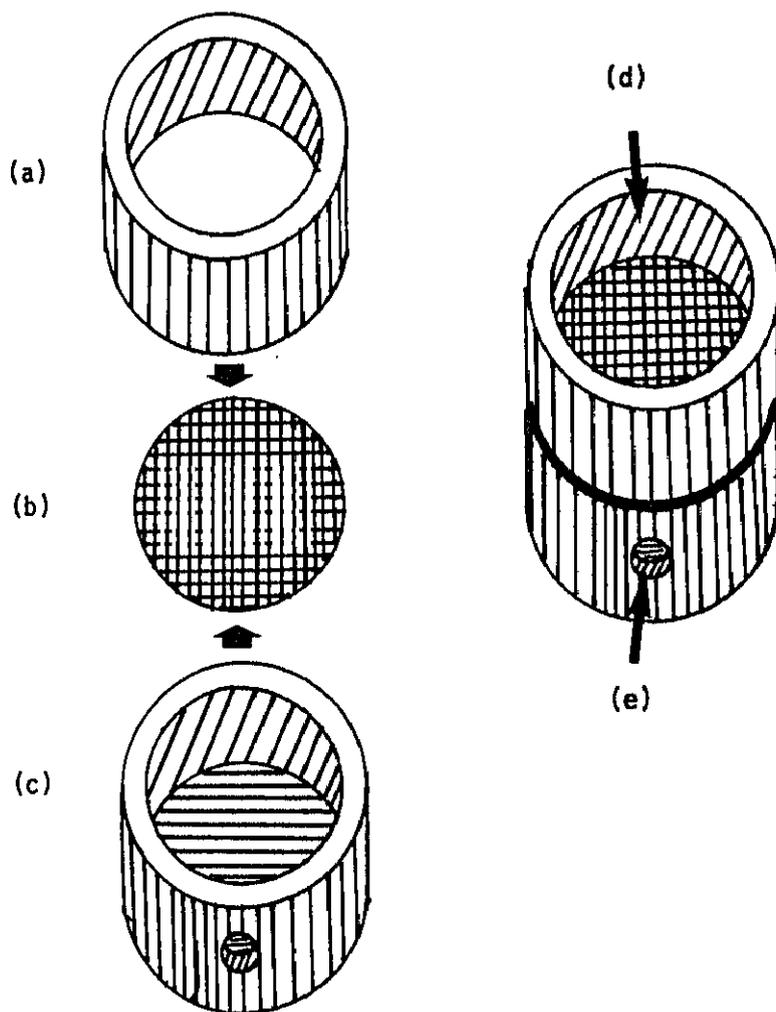


Figura 9. Camara de Boyden para los estudios de movilidad:
(a) compartimento superior; (b) filtro de nitrocelulosa;
(c) compartimento inferior; (d) suspensión de macrófagos;
(e) orificio de entrada para el quimioatrayente.

solución que será distinta según el estudio que realicemos.

- Quimiotaxis.

En nuestro estudio se utilizó como quimioatrayente, caseína purificada (sigma) preparada según el método de Wilkinson (153), tras inyectarla en el compartimento inferior de la cámara se procedió al sellado del orificio.

En la parte superior (Fig 9, d) se depositaron 300 μ l de la suspensión de células (2×10^6 MPM/ml) que previamente fueron incubados con el antibiótico o bien con HBSS durante 30 minutos a 37°C en baño de agitación.

Una vez llenas las cámaras se incubaron durante 3 horas a 37°C con un 100% de humedad relativa y una atmósfera de CO_2 del 5%. Posteriormente se procedió a su tinción y lectura.

- Movilidad espontánea.

Se siguió el mismo método empleado en el estudio de la quimiotaxis, con la variante de que se sustituyó el quimioatrayente por HBSS.

- Lectura y recuento.

Tras finalizar el período de incubación, se procedió a desmontar las cámaras, extraer los filtros, fijarlos y teñirlos siguiendo el siguiente proceso:

1- Metanol al 50%...	5 min.
2- Alcohol etílico al 75%..	2 min.
3- Agua destilada...	2 min.
4- Hematoxilina...	2 min.
5- Agua destilada...	2 min.
6- Agua del grifo...	5 min.
7- Alcohol etílico al 95%...	5 min.
8- Alcohol propílico al 98%..	5 min.
9- Alcohol propílico/xilol (1:1)..	5 min.
10-Xilol puro...	5 min.

La lectura se realizó en microscopio con un objetivo de 100 aumentos y se contó el número de macrófagos que atravesaron el filtro hasta llegar a su cara inferior, en 20 campos al azar.

3.2.1.5.- Adhesión y fagocitosis.

Se utilizaron placas MIF (Sterilin) en las que se depositaron 100 μ l de la suspensión celular (a una concentración de 1×10^6 MPM/ml.); posteriormente se incubó durante 30 minutos y se lavó con tampón fosfato a 37°C, de esta manera se eliminaron los macrófagos no adheridos (Fig. 10).

Paralelamente candidas cultivadas en medio de Saboureaud se tomaron con un asa de siembra y se resuspendieron en HBSS esteril, homogeneizándose la suspensión. Se ajustaron entonces a una concentración de 14×10^6 Cándidas/ml y despues de comprobar su viabilidad con azul de metileno (viabilidad superior al 95%) se incubaron en dos tipos de soluciones distintos:

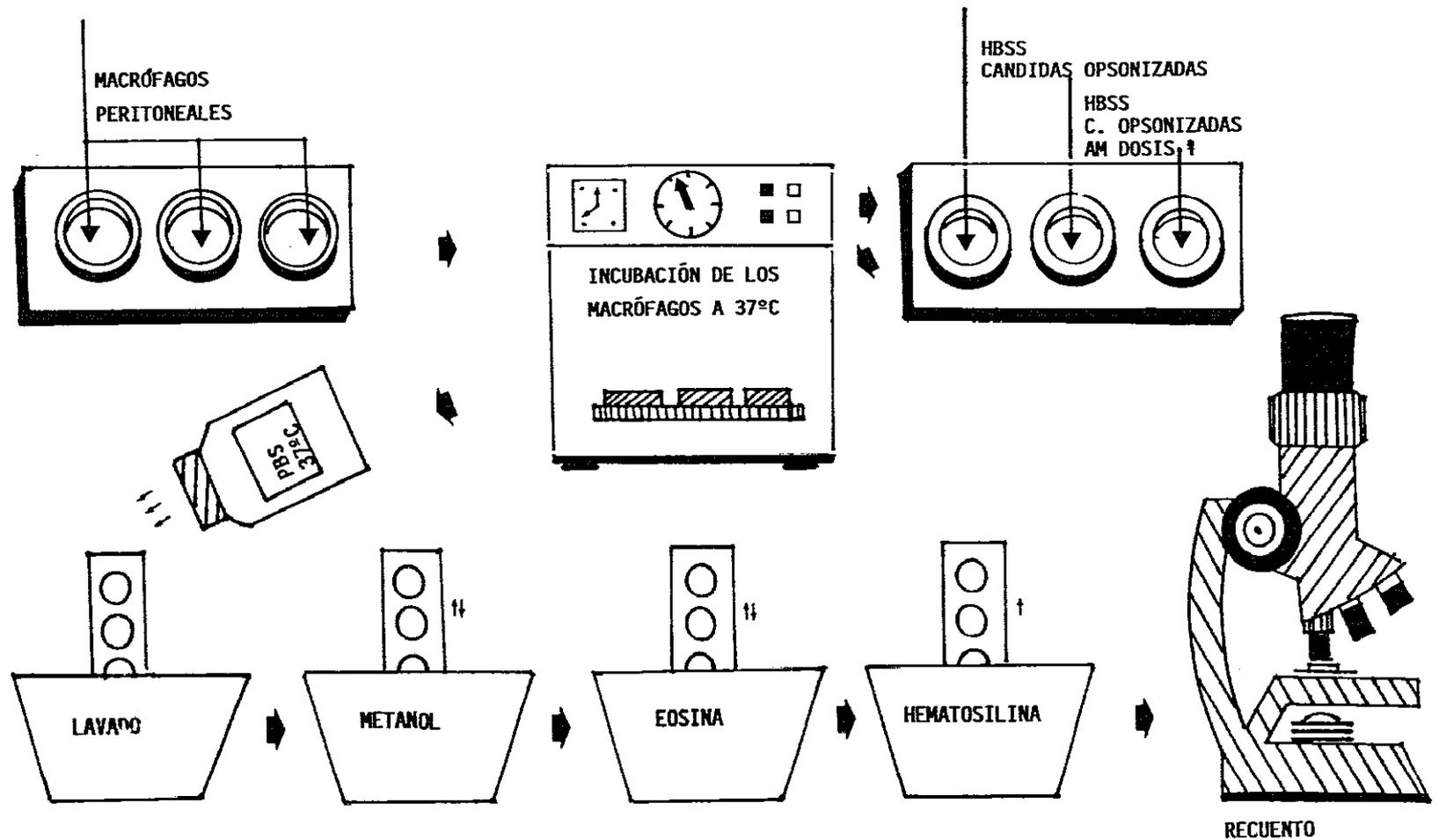


Figura 10. Representación esquemática de la técnica empleada para el estudio de la capacidad de adherencia y fagocitosis de Candida albicans por macrófagos peritoneales.

- En una solución A: Con 40 μ l de HBSS por cada 100 μ l de la suspensión de cándidas (Sin suero).
- En una solución B: Con 40 μ l de suero por cada 100 μ l de la suspensión de cándidas. (Con suero).

durante 30 minutos, a 37°C en baño de agitación a 60 rpm.

A cada pocillo de las placas MIF con los macrófagos ya adheridos se les añadió 100 μ l de HBSS, 100 μ l de la solución A o B según se trabaje con cándidas previamente opsonizadas o no y 100 μ l del antimicrobiano correspondiente (al triple de la concentración deseada). En los pocillos control se sustituyó el antimicrobiano por HBSS.

Después de 30 minutos de incubación en estufa a 37°C con humedad, se procedió a lavar las placas con tampón fosfato a 37°C (Fig. 10), seguidamente se fijaron con metanol durante 5 minutos y se tiñeron con eosina y hematoxilina.

Tras dejar transcurrir un período de secado de 24 horas a temperatura ambiente, se procedió al recuento de 100 macrófagos anotandose:

- El número de cándidas adheridas en un total de 100 macrófagos (capacidad adherente).
- El número de cándidas fagocitadas en un total de 100 macrófagos (capacidad fagocítica).

3.2.2.- EFECTO INDIRECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS ACTUANDO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE E. coli, S. aureus y C. albicans FRENTE A LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS PMN.

3.2.2.1.- Microorganismos y antimicrobianos.

Para el estudio se utilizaron un gram-negativo; Escherichia coli ATCC 25922, un gram-positivo; Staphylococcus aureus ATCC 25923 y un hongo; Candida albicans ATCC 10231. Los antimicrobianos fueron un betalactámico; cefotaxima, un aminoglicósido; netilmicina y un derivado triazólico; fluconazol. Se determinó su concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada bacteria por el método de macrodilución en tubo (154), para el fluconazol se calculó además de la CMI, la CI_{50} y la CI_{25} .

Los antimicrobianos se prepararon muy concentrados en solución salina, se repartieron en alícuotas de 500 μ l y se congelaron en nevera hasta su uso.

3.2.2.2.- Ajuste de los microorganismos por densidad optica.

Para determinar el número de ufc/ml en todo el estudio nos servimos de un espectrofotómetro, con este fin se prepararon unas rectas patrón resultado de la representación de la densidad óptica (a 580 nm para bacterias y 540 nm para candidas) frente al número de ufc/ml. Se partió de un tamaño de inóculo de 10^5 ufc/ml en caldo de MÜeller-Hinton para bacterias e YNB-Glucosa para hongos, se tomaron muestras cada 30 minutos en los que tras medir su D.O. se plaquearon

en agar de Müller-Hinton o Sabouraud y se incubaron en estufa a 37°C. Al día siguiente se procedió a su recuento en placa para determinar el número de colonias viables (Fig. 11).

Los valores de absorbancia más utilizados fueron de 0,3 para E. coli y de 0,25 para S. aureus obteniéndose una suspensión de 10^8 ufc/ml. En C. albicans el dato más utilizado fué de 0,11 para obtener un tamaño de inóculo de $5 \times 10^6 - 10^7$ ufc/ml.

3.2.2.3.- Obtención y recuento de los PMN.

Para la obtención de los PMN se recogieron muestras de sangre (por extracción venosa) procedentes de varios donantes sanos en tubos con EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid), se mezcló bien y seguidamente se añadieron 4 ml a 16 ml de una solución de cloruro amónico y bicarbonato sódico contenidos en un tubo con fondo cónico (155), se agitó durante 15 minutos en baño de agua fría a 4°C para lisar los eritrocitos y se centrifugó a 55 g durante 10 minutos (Fig. 12), a continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de la misma mezcla anterior repitiéndose el proceso una segunda vez. El pellet final se resuspendió en 5 ml de solución de Hanks (HBSS) sin calcio ni magnesio para evitar posibles activaciones de los PMN no deseadas.

Las células se mantuvieron en baño de agitación a 4°C hasta poco antes de su uso en la incubación con bacterias o candidas, momento en el que se volvió a centrifugar y resuspender en HBSS completo (Calcio, Magnesio y un 0,1% de gelatina) ajustándose a una concentración celular de 10^7 cel./ml en cámara de Neubauer

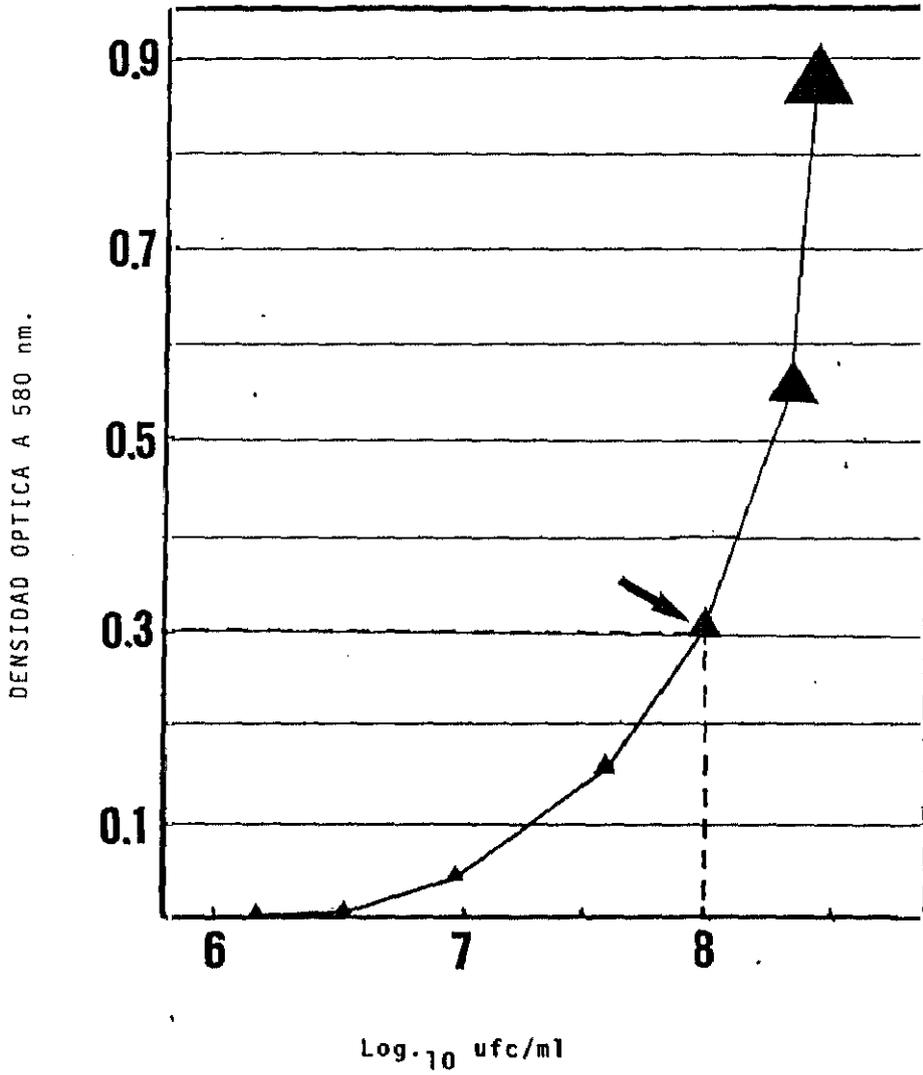
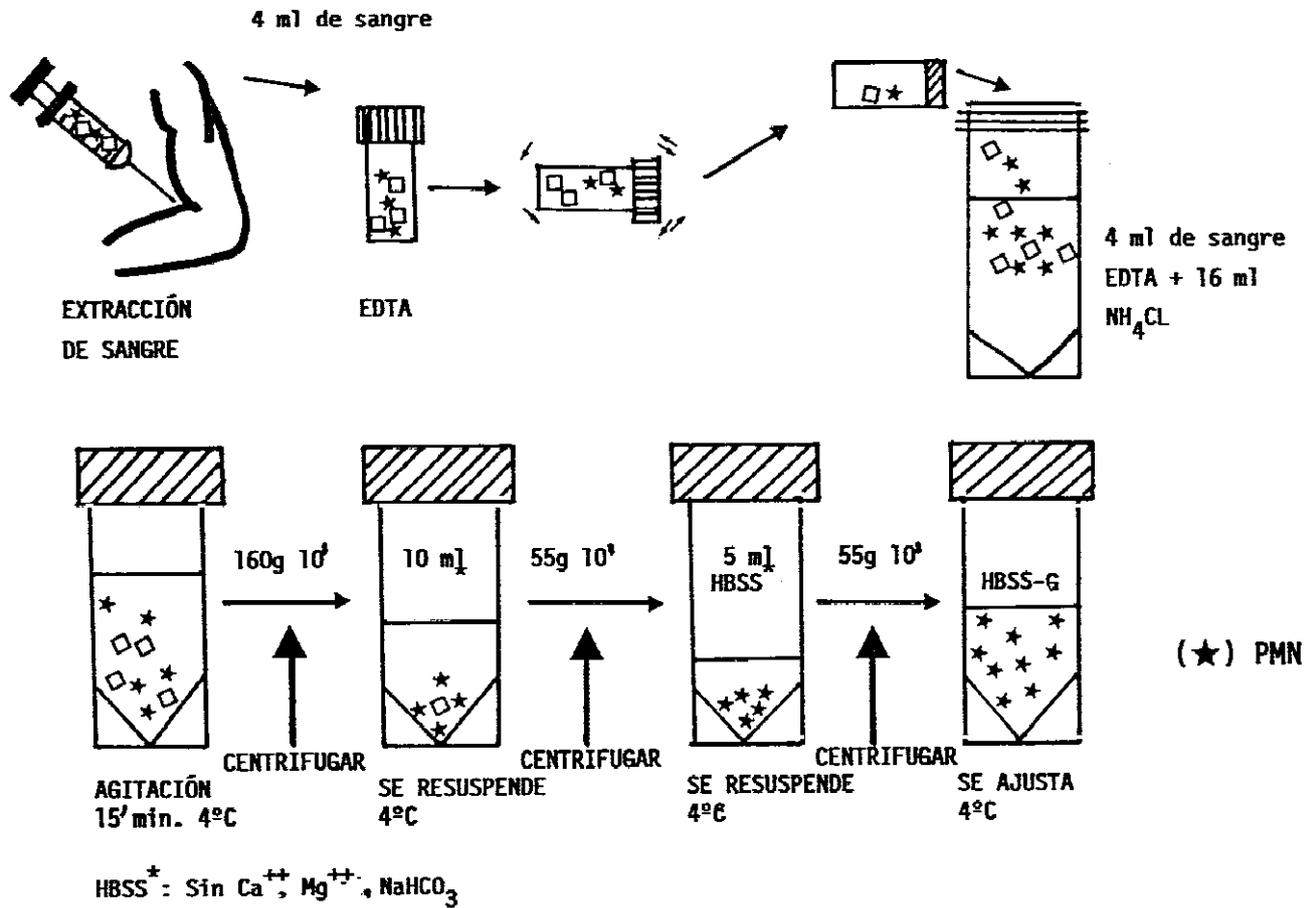


Figura 11. Representación de la absorbancia (a 580 nm) en función de la concentración celular de Escherichia coli.

Figura 12. Representación esquemática del método de separación de los neutrófilos por centrifugación diferencial.



(la pureza en PMN fué siempre superior al 85%). Paralelamente se evaluó su viabilidad celular con el colorante azul de tripano (156) que en este caso fué siempre superior al 95%.

3.2.2.4.- Estudio del efecto con bacterias.

- Determinación de las curvas de letalidad.

Se hicieron para estimar el mayor tiempo de incubación con antibiótico (4x CMI) que no reducía significativamente la viabilidad bacteriana. Se prepararon suspensiones bacterianas de E. coli y S. aureus en fase exponencial de crecimiento ajustadas a 10^8 ufc/ml por densidad óptica y se incubaron con 4X CMI de cefotaxima o netilmicina en caldo de Müeller-Hinton y S. aureus con 4X CMI de netilmicina en caldo de Triptona-Soja a 37°C y en baño de agitación. Cada 10-15 minutos se realizaron siembras de 20 µl sobre medio agar, se incubaron a 37°C en estufa durante toda la noche y se procedió a su recuento en placa al día siguiente, los resultados se representaron como el Log_{10} ufc/ml frente al tiempo de incubación en minutos.

- Valoración del crecimiento bacteriano en presencia o ausencia de PMN tras el tratamiento antibiótico.

Se tomó una colonia aislada en medio agar y se resuspendió en 50 ml de caldo de Müeller-Hinton, tras 18 horas de incubación a 37°C en estufa se recogieron 500 µl de caldo crecido y se volvieron a inocular en 50 ml de caldo, después de 2 o 3 horas de incubación a 37°C en baño de agitación (60 rpm) las bacterias

alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se ajustaron por D.O. a una concentración de 10^8 ufc/ml. Paralelamente se sacó de la nevera una alícuota del antibiótico previamente preparado en solución salina, se descongeló y se diluyó en caldo de Müeller-Hinton hasta obtener una concentración final de 10 veces la dosis de antibiótico requerido para el estudio (4xCMI).

A continuación se prepararon 2 pares de tubos de centrifuga de 20 ml (con tapón) cada una en las que se añadió (Fig. 13):

- Tubo (C); 1800 ul de bacterias y 200 ul de caldo de Müeller-Hinton.
- Tubo (CX) ; 1800 ul de bacterias y 200 ul de caldo de Müeller-Hinton.
- Tubo (AM); 1800 ul de bacterias y 200 ul de antibiótico disuelto en caldo de Müeller-Hinton; 4xCMI.
- Tubo (AMX); 1800 ul de bacterias y 200 ul de antibiótico disuelto en caldo de Müeller-Hinton; 4xCMI.

Se agitaron bien y se pusieron a incubar a 37°C en baño de agitación a 60 rpm durante un corto periodo de tiempo (10 - 30 minutos), al final se añadieron 8 ml de caldo libre de antibiótico a todos los tubos y se centrifugaron durante 10 minutos a 1800 g, se eliminó el sobrenadante dejandose en todos un pellet con 200 ul de caldo.

A los tubos marcados con X se les añadió 1600 ul de HBSS, se resuspendieron y se procedió a la determi-

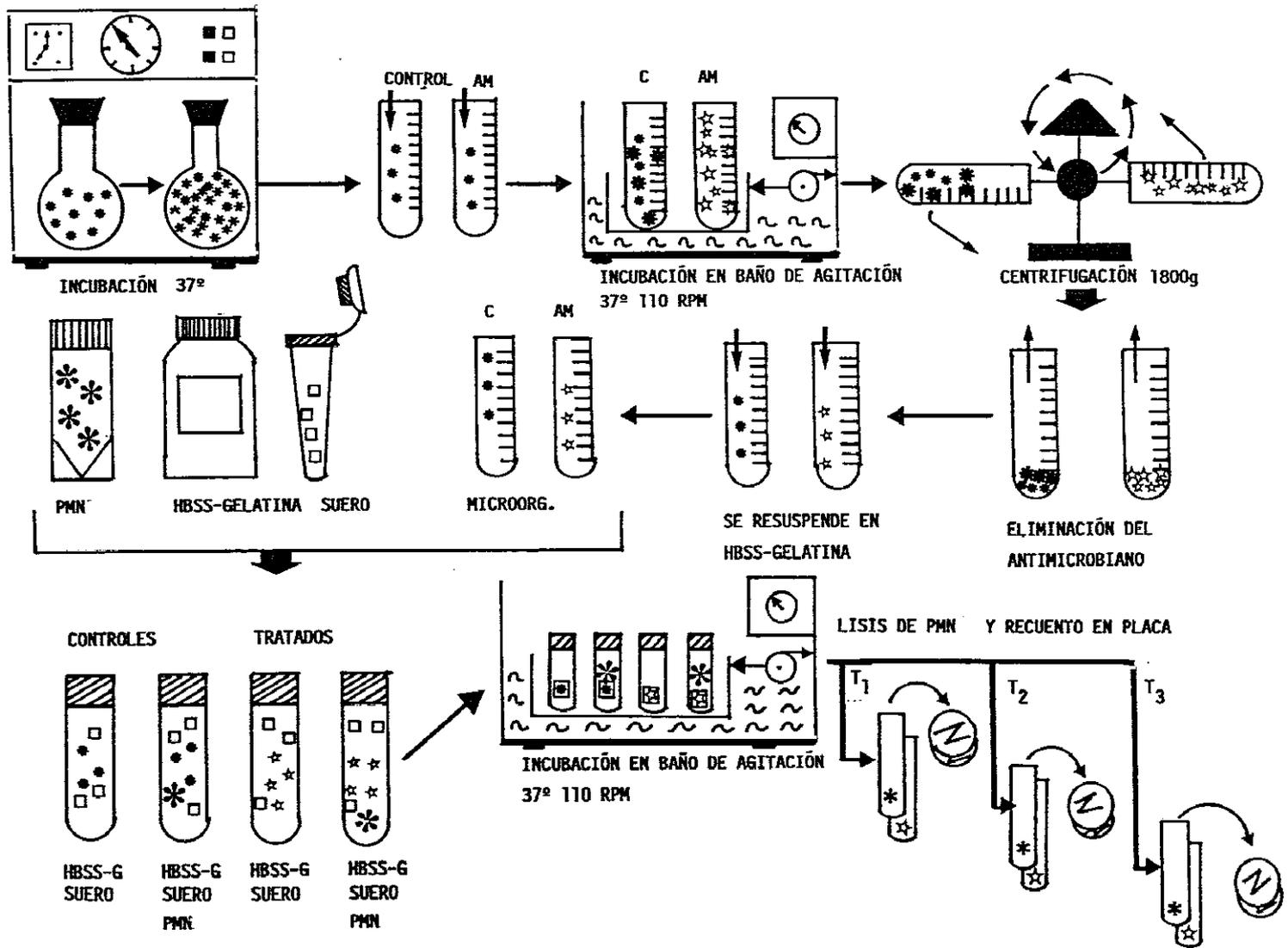


Figura 13. Representación esquemática de la técnica empleada para los estudios de crecimiento y fagocitosis de bacterias previamente tratadas con antibiótico, en presencia de suero o suero y PMN :

nación de sus densidades ópticas. Los otros dos tubos sin marcar se matuvieron en baño de agua fría (a 4°C) para detener su crecimiento.

Por la relación:

$$1800 \times \frac{\text{A. obtenida}}{\text{A. requerida}} - 200 \text{ ul} = \text{HBSS-gelatina por añadir.}$$

Absorbancia.

se calculó la cantidad de HBSS-gelatina que había que añadir a cada uno de los dos tubos sin marcar (C y AM) para obtener de nuevo una suspensión inicial de 10^8 ufc/ml. De este modo la concentración residual de antibiótico quedó reducida más de 500 veces.

Muestras de 50 μ l de estas bacterias tratadas con antibiótico o sin tratar se añadieron a dos tipos de tubos:

- 1.- Con 400 μ l de HBSS-gelatina y 50 μ l de suero.
- 2.- Con 200 μ l de HBSS-gelatina; 250 μ l de PMN y 50 μ l de suero.

de esta forma la relación final bacteria/PMN era de 2:1, la cantidad de suero requerido para una adecuada opsonización de un 10% y la concentración final de antibiótico diluida más de 5000 veces.

Los 4 tubos (2 tratados y 2 controles) se incubaron a 37°C en baño de agitación a 110 rpm; cada cierto periodo de tiempo se tomaron muestras de 20 µl y se añadieron a tubos con agua destilada esteril a 37°C y con un pH de 11 para lisar los PMN (157).

Todos los tubos se agitaron vigorosamente y se realizaron diluciones seriadas en solución salina, se tomaron muestras de 20 µl y se sembraron en medio agar de Müller-Hinton por triplicado; tras 18 horas de incubación en estufa a 37°C se procedió al recuento en placa expresando los resultados como Log₁₀ ufc/ml.

El mismo proceso antes descrito se repitió para S.aureus con 4xCMI de netilmicina pero en caldo de Triptona-Soja.

En este estudio se valoraron dos efectos:

a) El retraso en la cinética de crecimiento de las bacterias debido a la previa exposición con antibiótico. Este efecto se evaluó cada 30-60 minutos (t) y se expresó como porcentaje de retraso en el crecimiento (RC) debido al antibiótico mediante la relación:

$$RC_t = 100 \times (1 - (St / Sc))$$

donde St representa la diferencia entre el número de bacterias (previamente tratadas con antibiótico) a tiempo t y 0, expresados como Log₁₀ ufc/ml; y Sc representa la diferencia entre el número

de bacterias (sin tratar) a tiempo t y 0, expresados como Log_{10} ufc/ml.

b) El aumento de susceptibilidad de las bacterias previamente expuestas con antibiótico a los mecanismos microbicidas de los PMN. Este aumento se evaluó cada 30-60 minutos (t) y se expresó como el incremento del efecto bactericida de los PMN debido al antibiótico (EB) expresado en porcentajes mediante la relación:

$$EB_t = 100 \times \left(\frac{St - Pt}{Sc - Pc} - 1 \right)$$

donde Pt representa la diferencia entre el número de bacterias viables (previamente tratadas con antibiótico) incubadas con PMN a tiempo t y 0, expresados como Log_{10} ufc/ml y Pc representa la diferencia entre el número de bacterias viables (sin tratar) incubadas con PMN a tiempo t y 0, expresados como Log_{10} ufc/ml.

3.2.2.5.- Estudio del efecto con candidas.

- Determinación de la CI_{50} , CI_{25} y CMI.

Una suspensión de Candida albicans en 50 ml de medio YNB (Yeast Nitrogen Base Medium) con un 1% de glucosa en tampón fosfato 0,01 M se dejó crecer durante toda la noche en baño de agitación a 37°C y 60 rpm. Al día siguiente se ajusto la suspensión a una concentración comprendida entre 5×10^3 y 5×10^4 ufc/ml por densidad

óptica (0,11 de absorbancia a 540 nm) y luego se diluyó, siempre en YNB-glucosa, hasta alcanzar un tamaño de inóculo de 5×10^3 - 5×10^4 ufc/ml en dos matraces distintos. Uno se ajustó a pH 5.4 y el otro a pH 7,2; con ellos se prepararon dos baterías de 7 frascos cada una con 19 ml de la suspensión de candidas y 1 ml de antifúngico concentrado 20 veces para así, poder obtener finalmente las concentraciones en estudio (0,16 0,8 4 20 100 y 500 ug/ml de fluconazol). Los frascos control se prepararon añadiendo 1 ml de caldo YNB-glucosa,

Todos los caldos se incubaron a 37°C en baño de agitación a 60 rpm y cada cierto tiempo se valoró su crecimiento tomando muestras de 2 ml y midiendo los cambios de absorbancia y transmitancia. La CMI también se determinó a la vez, considerandola como la última concentración de antifúngico que no dejaba visualmente turbia la suspensión de C. albicans.

La concentración inhibitoria CI_{50} se calculó de los datos obtenidos por densidad óptica como la concentración de antifúngico más baja que cumplía el criterio:

$$\%T \geq (\%T_{\text{control}} + N (100 - \%T_{\text{control}}))$$

en donde $\%T_{\text{control}}$ es el porcentaje de transmisión del control (suspensión de candidas libre de antifúngico). N en este caso vale 1/2, esta relación fue formulada para definir la fracción de inhibición de crecimiento (N) en función de la turbidez en los tubos control sin antifúngico (158).

Las valoraciones de crecimiento se realizaron hasta las 48 horas.

Con un inóculo inicial mayor, $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ ufc/ml necesario para su estudio posterior con PMN, se intentó hallar su CI_{50} pero debido al fuerte efecto inóculo del fluconazol se optó por determinar su CI_{25} . Se utilizó el mismo procedimiento y N en este caso valió 1/4.

- Valoración del crecimiento de C. albicans en presencia o ausencia de PMN tras el tratamiento antifúngico.

El estudio se realizó del mismo modo que para las bacterias pero con algunas variantes, así las cándidas ajustadas a un tamaño de $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ ufc/ml se incubaron a $37^\circ C$ en baño de agitación a 60 rpm durante 6 horas en caldo YNB-glucosa, posteriormente se resuspendió en solución de Hanks (HBSS-gelatina 0.1%). Los PMN obtenidos por el mismo proceso anteriormente descrito se ajustaron a 5×10^6 cel./ml en HBSS-gelatina, muestras de 500 μl de C. albicans previamente tratadas con antifúngico se añadieron a 2 tipos de tubos:

1- 400 μl de HBSS-gelatina y 100 μl de suero.

2- 150 μl de HBSS-gelatina, 250 μl de PMN y 100 μl de suero.

de esta manera la relación final cándida/PMN fué de 2:1. Tubos de cándidas sin previo tratamiento se prepararon de la misma forma. El resto del proceso fué idéntico al descrito anteriormente para las bacterias con la diferencia de que la siembra y el recuento en placa se realizó sobre agar Sabouraud.

3.2.3.- ANALISIS ESTADISTICO.

Se calculó para cada grupo de datos la media aritmética (\bar{X}) y desviación standard (D.E.) según las formulas habituales para el número de datos manejados.

Para comparar estadísticamente las medias de dos grupos experimentales, se realizaron pruebas de hipótesis a partir de los parámetros muestrales, estableciendose como hipótesis nula la igualdad entre las medias poblacionales y como hipótesis alternativa la diferencia entre ambas, con un nivel de significación del 5%. Así pues se utilizó la prueba del estadístico "t" de Student.

En los casos en que fué necesario, antes de aplicar la fórmula del estadístico "t", se compararon las varianzas muestrales mediante la prueba de la "F" de Fisher-Snedecor. En las muestras que no se ajustaban a una distribución Gaussiana (no paramétrica) se utilizó la prueba del test de Wilcoxon.

Se consideró que no habia significación (n.s.) cuando el valor de la probabilidad de la significación (p) era mayor de 0,05, se dió el valor de "significativo" para $p < 0,05$.

4.- RESULTADOS, TABLAS Y GRAFICAS

4.1.- Resultados obtenidos.

EFFECTO DIRECTO DE CEFOTAXIMA Y NETILMICINA SOBRE LAS FUNCIONES IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS.

La influencia de ambos antibióticos en las funciones del macrófago analizadas se muestran en los siguientes resultados:

Adherencia

Las alteraciones en la adherencia de los macrófagos peritoneales murinos se estudió utilizando placas MIF tras una incubación de 30 minutos con las diferentes concentraciones de los antibióticos. Posteriormente se calculó el índice de adherencia.

Cefotaxima no modificó la capacidad de adherencia respecto a los controles (tabla I). De igual modo, el análisis estadístico demostró que netilmicina no afectaba de forma significativa a las distintas concentraciones ensayadas ($p > 0,05$) la adherencia a las placas MIF (tabla II).

Movilidad espontánea

Los resultados obtenidos en los estudios de movilidad espontánea de los macrófagos incubados con cefotaxima y netilmicina se expresaron como el número de células que atraviesan el filtro en un área de 20 campos al azar.

Cefotaxima potenció la movilidad espontánea a una concentración terapéutica de 12 mg/l de forma significativa ($p < 0,05$), mientras que al emplear netilmicina no se observó efecto alguno (tablas III y IV; figuras 14 y 15).

Quimiotaxis

Tras la incubación de los macrófagos con las distintas concentraciones de antibiótico y utilizando como factor quimioatrayente caseína, se estudió la migración dirigida o quimiotaxis.

Cefotaxima produjo un aumento de la quimiotaxis a una concentración superior a la terapéutica, 120 mg/l ($p < 0,05$), mientras que netilmicina no interfirió el proceso de migración dirigida de los macrófagos (tablas V y VI; figuras 14 y 15).

Fagocitosis

El proceso de fagocitosis engloba dos partes fundamentales: la adhesión y la ingesta. Primero se incubaron los macrófagos durante 30 minutos con las distintas concentraciones de cefotaxima y netilmicina, y después se analizó la adherencia y la ingesta de cándidas normales o previamente opsonizadas con suero.

Cefotaxima y netilmicina no afectaron significativamente a la capacidad adherente ($p > 0,05$), esto es, el número de cándidas adheridas en 100 macrófagos con o sin suero (Tablas VII, VIII, IX y X; figuras 16 y 17).

La ingesta de cándidas por los macrófagos incubados con cefotaxima y netilmicina no se vió afectada significativamente ($p > 0,05$), esto es, el número de cándidas fagocitadas en 100 macrófagos en presencia o ausencia de suero (tablas VII, VIII, IX y X; figuras 16 y 17).

EFFECTO INDIRECTO DE CEFOTAXIMA Y NETILMICINA ACTUANDO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE E. coli Y S. aureus FRENTE A LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN).

CMI y Curvas de letalidad

Las concentraciones mínimas inhibitorias de cefotaxima para E. coli y S. aureus fueron respectivamente de 0,12 y 2 $\mu\text{g/ml}$ mientras que con netilmicina fueron de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

De las curvas de letalidad realizadas (a 4 veces la CMI) para estimar el tiempo máximo de exposición de E. coli y S. aureus a los antibióticos sin que por ello quedaran afectadas sus viabilidades (pero que pudieran producir alteraciones no letales), se establecieron 30 minutos para cefotaxima y 10 minutos para netilmicina en caldo de Müller-Hinton mientras que este último se alargó hasta 30 minutos en caldo de Triptona-Soja con S. aureus (tablas XI, XII y XIII; figuras 18, 19, 20 y 21).

Cinéticas de crecimiento en presencia o ausencia de PMN.

La previa incubación de E. coli durante 30 minutos con cefotaxima aceleró su ciclo de división normal en la primera hora posterior al tratamiento (104,5% más que el control, $p < 0.05$). Con S. aureus el tratamiento retrasó su crecimiento normal durante 2 horas alcanzando su máximo en la primera media hora (129,4% a los 30 minutos, 87% a los 60 minutos, 56,1% a los 90 minutos y 48,9% a los 120 minutos respecto al control, $p < 0,05$) (Tablas XVI y XVIII; figuras 24 y 26).

La capacidad microbicida de los PMN se vió incrementada sensiblemente tras el tratamiento de E. coli y S. aureus con cefotaxima. En el primer caso este efecto duró 3 horas (82,7% a los 60 minutos, 87,5% a los 120 minutos y 112,8% a los 180 minutos respecto al control, $p < 0.05$). Con S. aureus también se detectó este incremento pero a partir de la primera media hora posterior al tratamiento antibiótico (120%, 45,7% y 13,1% a los 60, 90 y 120 minutos respecto a su control, $p < 0,05$) (tablas XVI y XVIII; figuras 24 y 26).

El previo tratamiento de E. coli y S. aureus con netilmicina condujo a resultados distintos. Así mientras el tratamiento de S. aureus con netilmicina produjo un retraso en su crecimiento normal durante la primera hora (44,2% a los 30 minutos y 23,1% a los 60 minutos respecto al control, $p < 0,05$), con E. coli no se apreció ningún retraso (tablas XVII y XIX; figuras 25 y 27).

Netilmicina aumentó la capacidad microbicida de los PMN durante 1 hora tanto con E. coli (62% a los 60 minutos más que el control, $p < 0.05$) como con S. aureus (89,4% y 27% a los 30 y 60 minutos respecto al control, $p < 0.05$) (tablas XVII y XIX; figuras 25 y 27).

El previo tratamiento de S. aureus con netilmicina durante 10 minutos en caldo de Triptona-Soja no ocasionó ningún efecto tanto a nivel de su crecimiento como a su susceptibilidad a los mecanismos microbicidas de los leucocitos polimorfonucleares humanos (tabla XX ; figura 28).

EFFECTO INDIRECTO DEL FLUCONAZOL ACTUANDO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE Candida albicans FRENTE A LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS PMN.

Debido a que el fluconazol es fungiestático, a la hora de escoger la concentración y el tiempo de incubación adecuados para el tratamiento de C. albicans se calculó su CMI y la CI_{50} para distintos períodos de tiempo ensayando con varias concentraciones de antifúngico en caldo YNB al 1% de glucosa a pH 5,4 y 7,2 (0,16 0,8 4,0 20 100 y 500 ug/ml).

A pH ácido a las 24 horas la CMI (determinada visualmente) fué de 4,0 $\mu\text{g/ml}$ y la CI_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ mientras que a pH neutro la CMI fué de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ al igual que la CI_{50} . A las 48 horas de incubación los valores de CMI y CI_{50} eran iguales, siendo de 100 $\mu\text{g/ml}$ a pH 5,4 y de 4,0 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7,2 (tabla XIV; figura 22).

Estos resultados se obtuvieron con un tamaño de inóculo de 5×10^3 - 5×10^4 ufc/ml, como necesitábamos un inóculo de cándidas mayor para el estudio con los PMN y la actividad del fluconazol es dependiente del tamaño del inóculo y del pH del medio se optó por repetir la CMI y la CI_{50} para un tamaño de inóculo de 5×10^6 - 10^7 ufc/ml. Como resultado final y visto que no había una CI_{50} entre las concentraciones ensayadas para ese tamaño de inóculo se optó por la CI_{25} a pH neutro (4 $\mu\text{g/ml}$ a las 6 horas de exposición continuada) como concentración y tiempo de exposición para el tratamiento de las cándidas (tabla XV; figura 23).

Como resultado se esta exposición tras lavar e incubar las cándidas en HBSS-gelatina con un 10%

de suero, se detectó un retraso en su crecimiento normal durante las tres horas sucesivas (72,4%, 60% y 55% a los 60, 120 y 180 minutos respecto a su control, $p < 0,05$). También aumento su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos polimorfonucleares humanos en la primera hora (43,8% a los 60 minutos más que el control, $p < 0,05$) (tabla XXI; figura 29).

4.2.- Tablas.

Tabla I.- Efecto de cefotaxima en la adherencia de los macrófagos.

Concentraciones (mgr/l)	Indice de [*] Adherencia	% del valor basal	P
0	95 \pm 3	100 %	
1,2	94 \pm 3	98,9 %	n.s.
12	96 \pm 1	101 %	n.s.
60	95 \pm 1	100 %	n.s.
120	96 \pm 1	101 %	n.s.

* Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm SD$.

$$\text{Porcentaje de macrófagos adheridos: } 100 \frac{M_i - M_f}{M_i}$$

Grupos de 9 - 10 ratones.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados

n.s. no significativo ($P > 0,05$)

Tabla II.- Efecto de la netilmicina en la adherencia de los macrófagos.

Concentraciones (mgr/l)	Indice de [*] Adherencia	% del valor basal	P
0	99 ± 4	100 %	
0,5	98 ± 6	99 %	n.s.
2	97 ± 4	98 %	n.s.
8	98 ± 6	99 %	n.s.
32	99 ± 7	100 %	n.s.

* Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm SD$.

$$\text{Porcentaje de macrófagos adheridos: } 100 \frac{M_i - M_f}{M_i}$$

Grupos de 7 - 8 ratones.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

Tabla III.- Efecto de la cefotaxima en la Movilidad Espontánea de los macrófagos.

Concentraciones (mgr/l)	Movilidad* Espontánea	% del valor Basal	P
0	10 ± 3	100 %	
1,2	9 ± 4	90 %	n.s.
12	19 ± 6	190 %	s.
60	11 ± 3	110 %	n.s.
120	12 ± 3	120 %	n.s.

* Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm SD$.

Grupos de 7 - 8 ratones.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

s. significativo ($P < 0,05$).

Tabla IV.- Efecto de la netilmicina en la Movilidad Espontanea de los macrófagos.

Concentraciones (mgr/l)	Movilidad* Espontánea	% del valor Basal	P
0	19 ± 7	100 %	
0.5	22 ± 7	115 %	n.s.
2	14 ± 5	73,6 %	n.s.
8	25 ± 9	131 %	n.s.
32	19 ± 6	100 %	n.s.

* Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm SD$.

Grupos de 7 - 8 ratones.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

Tabla V.- Efecto de la cefotaxima en la Quimiotaxis de los macrófagos.

Concentraciones (mgr/l)	Quimiotaxis *	% del valor Basal	P
0	33 \pm 9	100 %	..
1,2	21 \pm 8	63 %	n.s.
12	26 \pm 8	78 %	n.s.
60	36 \pm 10	109 %	n.s.
120	59 \pm 16	178 %	s.

* Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm$ SD.

Grupos de 7 - 9 ratones.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

s. significativo ($p < 0,05$).

Tabla VI.- Efecto de la netilmicina en la Quimiotaxis de los macrófagos.

Concentraciones (mgr/l)	Quimiotaxis*	% del valor Basal	P
0	7 ± 2	100 %	
0.5	8 ± 2	114 %	n.s.
2	6 ± 2	85,7 %	n.s.
8	7 ± 2	100 %	n.s.
32	9 ± 3	128,5 %	n.s.

* Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm SD$.

Grupos de 7 - 8 ratones.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0.05$).

Tabla VII.- Efecto de cefotaxima en la capacidad de adherencia y fagocitosis de los macrófagos en ausencia de suero.

Concentraciones (mgr/l)	Capacidad ^{(1)*} Adherente	P	Capacidad ^{(2)*} Fagocitosis	P
0	39 ± 13		11 ± 3	
1,2	41 ± 12	n.s.	6 ± 4	n.s.
12	35 ± 10	n.s.	9 ± 3	n.s.
60	38 ± 11	n.s.	6 ± 5	n.s.
120	32 ± 18	n.s.	7 ± 5	n.s.

* Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm$ SD.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

(1) Grupos de 7 ratones.

(2) Grupos de 6 - 8 ratones.

Tabla VIII.- Efecto de cefotaxima en la capacidad de adherencia y fagocitosis de los macrófagos en presencia de suero.

Concentraciones (mgr/l)	Capacidad ^{(1)*} Adherente	P	Capacidad ^{(2)*} Fagocitosis	P
0	41 ± 11		38 ± 6	
1,2	31 ± 15	n.s.	35 ± 7	n.s.
12	30 ± 17	n.s.	34 ± 9	n.s.
60	42 ± 12	n.s.	38 ± 10	n.s.
120	32 ± 14	n.s.	36 ± 10	n.s.

* Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm SD$.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.
n.s. no significativo ($P > 0,05$).

(1) Grupos de 16 ratones.

(2) Grupos de 17 ratones.

Tabla IX.- Efecto de netilmicina en la capacidad de adherencia y fagocitosis de los macrófagos en ausencia de suero.

Concentraciones (mgr/l)	Capacidad ^{(1)*} Adherente	P	Capacidad ^{(2)*} Fagocitosis	P
0	31 ± 7		18 ± 10	
0,5	29 ± 7	n.s.	12 ± 7	n.s.
2	25 ± 7	n.s.	17 ± 6	n.s.
8	20 ± 6	n.s.	12 ± 4	n.s.
32	25 ± 9	n.s.	12 ± 4	n.s.

* Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm SD$.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

(1) Grupos de 7 - 9 ratones.

(2) Grupos de 6 - 8 ratones.

Tabla X.- Efecto de la netilmicina en la capacidad de adherencia y fagocitosis de los macrófagos en presencia de suero.

Concentraciones (mgr/l)	Capacidad ^{(1)*} Adherente	P	Capacidad ^{(2)*} Fagocitosis	P
0	39 ± 12	n.s.	51 ± 17	n.s.
0,5	36 ± 10	n.s.	48 ± 14	n.s.
2	32 ± 7	n.s.	45 ± 7	n.s.
8	30 ± 8	n.s.	53 ± 16	n.s.
32	35 ± 14	n.s.	59 ± 14	n.s.

* Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm SD$.

P refleja las diferencias entre el control y los grupos tratados.

n.s. no significativo ($P > 0,05$).

(1) Grupos de 8 ratones.

(2) Grupos de 8 - 9 ratones.

Tabla XI.- Curvas de letalidad de Escherichia coli con 4xCMi de cefotaxima y netilmicina en caldo de Mueller Hinton.

Tiempo	control	cefotaxima	tiempo	control	netilmicina
0	7.90 ± 0.03	7.90 ± 0.03	0	7.86 ± 0.07	7.86 ± 0.06
15	7.97 ± 0.05	7.88 ± 0.04	10	7.94 ± 0.07	7.81 ± 0.03
30	8.00 ± 0.06	7.71 ± 0.04	20	8.12 ± 0.04	7.27 ± 0.05
45	8.08 ± 0.04	7.30 ± 0.02	30	8.19 ± 0.07	5.80 ± 0.06
60	8.19 ± 0.06	6.40 ± 0.06	40	8.23 ± 0.03	5.16 ± 0.02

*, los resultados se expresan en Log₁₀ ufc/ml como X ± SD de 6 ensayos.

Tabla XII.- Curvas de letalidad de Staphylococcus aureus con 4xCMi de cefotaxima y netilmicina en caldo de Mueller Hinton.

Tiempo	control	cefotaxima	tiempo	control	netilmicina
0	7.76 \pm 0.01	7.76 \pm 0.01	0	7.80 \pm 0.08	7.80 \pm 0.08
15	7.99 \pm 0.05	7.71 \pm 0.01	10	8.06 \pm 0.18	7.45 \pm 0.07
30	8.04 \pm 0.04	7.59 \pm 0.01	20	8.19 \pm 0.02	6.69 \pm 0.15
45	8.23 \pm 0.05	7.17 \pm 0.03	30	8.39 \pm 0.22	6.08 \pm 0.01
60	8.51 \pm 0.01	6.50 \pm 0.19	40	8.71 \pm 0.04	5.77 \pm 0.05

*, los resultados se expresan en Log_{10} ufc/ml como $X \pm \text{SD}$ de 5 ensayos.

Tabla XIII.- Curva de letalidad de Staphylococcus aureus con 4xCMi de netilmicina en caldo de Triptona-Soja.

Tiempo	control	netilmicina
0	7.87 \pm 0.01	7.87 \pm 0.01
10	8.18 \pm 0.07	7.85 \pm 0.01
20	8.33 \pm 0.02	7.69 \pm 0.02
30	8.57 \pm 0.03	7.37 \pm 0.03
40	8.87 \pm 0.01	6.66 \pm 0.13

*, los resultados se expresan en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$ de 6 ensayos.

Tabla XIV.- Efecto del incremento de la concentración de fluconazol en el crecimiento de Candida albicans en caldo YNB-Glucosa a pH 7.2 y 5.4 con un inóculo de partida de 5×10^3 - 5×10^4 ufc/ml.

Tiempo de incubación (horas)															
	0	6	12	24	30	36	48	0	6	12	24	30	36	48	
Dosis	Absorbancia (540 nm)							Absorbancia (540 nm)							
Control	0.0	0.04	0.66	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
0.16		0.04	0.39	1.0	1.0	1.0	1.0	0.28	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
0.8		0.05	0.10	☆☆	0.22	0.56	1.0	1.0	0.18	0.31	1.0	1.0	1.0	1.0	
4.0		0.03	0.06	0.09	0.12	0.19	☆☆	0.29	0.12	0.15	☆	0.31	0.41	0.49	0.53
20		0.04	0.07	0.07	0.08	0.12	0.16	0.09	0.11	☆	0.17	0.23	0.31	0.36	
100		0.02	0.05	0.06	0.06	0.09	0.10	0.09	0.10	0.12	0.20	0.21	☆☆	0.24	
500		0.01	0.05	0.05	0.05	0.08	0.07	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.11	
(mgr/l)															
☆CMI	Incubación a pH 7.2							Incubación a pH 5.4							
★IC ₅₀															

Tabla XV.- Efecto del incremento de la concentración de fluconazol en el crecimiento de Candida albicans en caldo YNB-Glucosa a pH 7.2 y 5.4 con un inóculo de partida de $5 \times 10^6 - 10^7$ ufc/ml.

Tiempo de incubación (horas)														
	0	2	4	6	8	10	12	0	2	4	6	8	10	12
Dosis	Absorbancia (540 nm)							Absorbancia (540 nm)						
Control	0.10	0.16	0.37	0.66	1.0	1.0	1.0	0.10	0.26	0.74	1.0	1.0	1.0	1.0
0.16		0.18	0.32	0.59	0.98	1.0	1.0		0.26	0.68	1.0	1.0	1.0	1.0
0.8		0.16	0.28	0.50	0.61	0.81	1.0		0.25	0.63	1.0	1.0	1.0	1.0
4.0		0.18	0.26	0.42*	0.50	0.55	0.59		0.24	0.57	0.89	1.0	1.0	1.0
20		0.16	0.23	0.38	0.44	0.48	0.50		0.23	0.52	0.80	0.92	0.99	1.0
100		0.17	0.22	0.33	0.36	0.39	0.43		0.28	0.49	0.76	0.88	0.91	0.92
500 (mgr/l)		0.16	0.22	0.26	0.31	0.33	0.35		0.26	0.41	0.71	0.81	0.86	0.88
* IC ₂₅	Incubación a pH 7.2							Incubación a pH 5.4						

111

Tabla XVI.- Efecto del pretratamiento de E. coli con cefotaxima (4x CMI durante 30 minutos en caldo de Müeller-Hinton) en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los PMN en presencia de un 10% de suero.

Tiempo (min.)	CONTROL		PRETRATADO		RETRASO EN EL CRECIMIENTO (R.C.)	EFECTO BACTERICIDA POR PMN (E.B.)
	Suero (Sc)	Suero + PMN (Pc)	Suero (St)	Suero + PMN (Pt)		
0	0	0	0	0	-	-
60	0.44 ± 0.23	-0.37 ± 0.2	0.9 ± 0.21	-0.58 ± 0.22	-104.5% *	82.7%.*
120	0.72 ± 0.28	-0.45 ± 0.18	1.15 ± 0.3	-1.10 ± 0.3	n.s.	87.5%.*
180	0.90 ± 0.27	-0.50 ± 0.21	1.27 ± 0.3	-1.71 ± 0.28	n.s.	112.8%.*

n.s.; no significativo ($p > 0,05$); *, significativo ($p < 0,05$), resultados expresados en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos sanos.

Tabla XVII.- Efecto del pretratamiento de E. coli con netilmicina (4xCMI durante 10 minutos en caldo de Müeller-Hinton) en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los PMN en presencia de un 10% de suero.

Tiempo (min.)	CONTROL		PRETRATADO		RETRASO EN EL CRECIMIENTO (R.C.)	EFECTO BACTERICIDA POR PMN (E.B.)
	Suero (Sc)	Suero + PMN (Pc)	Suero (St)	Suero + PMN (Pt)		
0	0	0	0	0	-	-
60	0.36 ± 0.2	-0.22 ± 0.15	0.19 ± 0.18	-0.75 ± 0.09	n.s.	62% *
120	0.73 ± 0.21	-0.63 ± 0.2	0.51 ± 0.21	-0.97 ± 0.23	n.s.	n.s.
180	1.07 ± 0.2	-0.71 ± 0.25	0.80 ± 0.23	-1.0 ± 0.18	n.s.	n.s.

n.s.; no significativo ($p > 0,05$); *, significativo ($p < 0,05$), resultados expresados en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos sanos.

Tabla XVIII.- Efecto del pretratamiento de S. aureus con cefotaxima (4xCMi durante 30 minutos en caldo de Müeller-Hinton) en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los PMN en presencia de un 10% de suero.

Tiempo (min.)	CONTROL		PRETRATADO		RETRASO EN EL CRECIMIENTO (R.C.)	EFECTO BACTERICIDA POR PMN (E.B.)
	Suero (Sc)	Suero + PMN (Pc)	Suero (St)	Suero + PMN (Pt)		
0	0	0	0	0	-	-
30	0.34 ± 0.07	0.18 ± 0.04	-0.10 ± 0.08	-0.26 ± 0.08	129.4% *	n.s.
60	0.52 ± 0.05	0.33 ± 0.08	0.07 ± 0.08	-0.35 ± 0.08	87% *	120%.*
90	0.82 ± 0.08	0.47 ± 0.1	0.33 ± 0.08	-0.15 ± 0.1	56.1% *	45.1%.*
120	0.96 ± 0.09	0.58 ± 0.1	0.48 ± 0.08	0.06 ± 0.08	48.9% *	13.1%.*

n.s; no significativo ($p > 0,05$); *, significativo ($p < 0,05$), resultados expresados en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos sanos.

Tabla XIX.- Efecto del pretratamiento de *S. aureus* con netilmicina (4xCMi durante 10 minutos en caldo de Müller-Hinton) en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los PMN en presencia de un 10% de suero.

Tiempo (min.)	CONTROL		PRETRATADO		RETRASO EN EL CRECIMIENTO (R.C.)	EFECTO BACTERICIDA POR PMN (E.B.)
	Suero (Sc)	Suero + PMN (Pc)	Suero (St)	Suero + PMN (Pt)		
0	0	0	0	0	-	-
30	0.34 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.19 ± 0.03	-0.17 ± 0.1	44.2% *	89.4%.*
60	0.52 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.40 ± 0.04	-0.02 ± 0.08	23.1% *	27.2%.*
90	0.73 ± 0.06	0.29 ± 0.08	0.64 ± 0.04	0.22 ± 0.07	n.s.	n.s.
120	0.89 ± 0.09	0.35 ± 0.1	0.67 ± 0.1	0.27 ± 0.09	n.s.	n.s.

n.s; no significativo ($p > 0,05$); *, significativo ($p < 0,05$); resultados expresados en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 7 individuos sanos.

Tabla XX.- Efecto del pretratamiento de S. aureus con netilmicina (4xCMI durante 10 minutos en caldo de Triptona-Soja) en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los PMN en presencia de un 10% de suero.

Tiempo (min.)	CONTROL		PRETRATADO		RETRASO EN EL CRECIMIENTO (R.C.)	EFECTO BACTERÍCIDO POR PMN (E.B.)
	Suero (Sc)	Suero + PMN (Pc)	Suero (St)	Suero + PMN (Pt)		
0	0	0	0	0	-	-
30	0.54 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.20 ± 0.04	n.s.	n.s.
60	0.61 ± 0.08	0.31 ± 0.04	0.72 ± 0.08	0.28 ± 0.1	n.s.	n.s.
90	0.87 ± 0.07	0.33 ± 0.04	0.85 ± 0.08	0.37 ± 0.1	n.s.	n.s.
120	1.05 ± 0.16	0.41 ± 0.16	0.84 ± 0.08	0.40 ± 0.26	n.s.	n.s.

n.s; no significativo ($p > 0,05$); resultados expresados en Log_{10} ufc/ml como $X \pm \text{SD}$. Grupos de 6 individuos sanos.

Tabla XXI.- Efecto del pretratamiento de C. albicans con fluconazol (4 mgr/l durante 6 horas en caldo YNB-Glucosa) en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los PMN en presencia de un 10% de suero.

Tiempo (min.)	CONTROL		PRETRATADO		RETRASO EN EL CRECIMIENTO (R.C.)	EFECTO FUNGICIDA POR PMN (E.F.)
	Suero (Sc)	Suero + PMN (Pc)	Suero (St)	Suero + PMN (Pt)		
0	0	0	0	0	-	-
60	0.13 ± 0.03	-0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.03	-0.26 ± 0.04	72.4% *	43.8%.*
120	0.50 ± 0.06	-0.27 ± 0.08	0.20 ± 0.04	-0.36 ± 0.09	60% *	n.s.
180	0.65 ± 0.05	-0.42 ± 0.06	0.29 ± 0.07	-0.54 ± 0.09	55% *	n.s.

n.s; no significativo ($p > 0,05$); *, significativo ($p < 0,05$); resultados expresados en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos sanos.

4.3.- Gráficas.

Figura 14. Índice de movilidad espontánea (columnas blancas) y quimiotaxis (columnas rayadas) de macrófagos peritoneales murinos de ratones Balb/c, incubados con cefotaxima. Índice representado como porcentaje del valor basal.

Grupos de 7 - 8 ratones. *, significativo ($p < 0,05$).

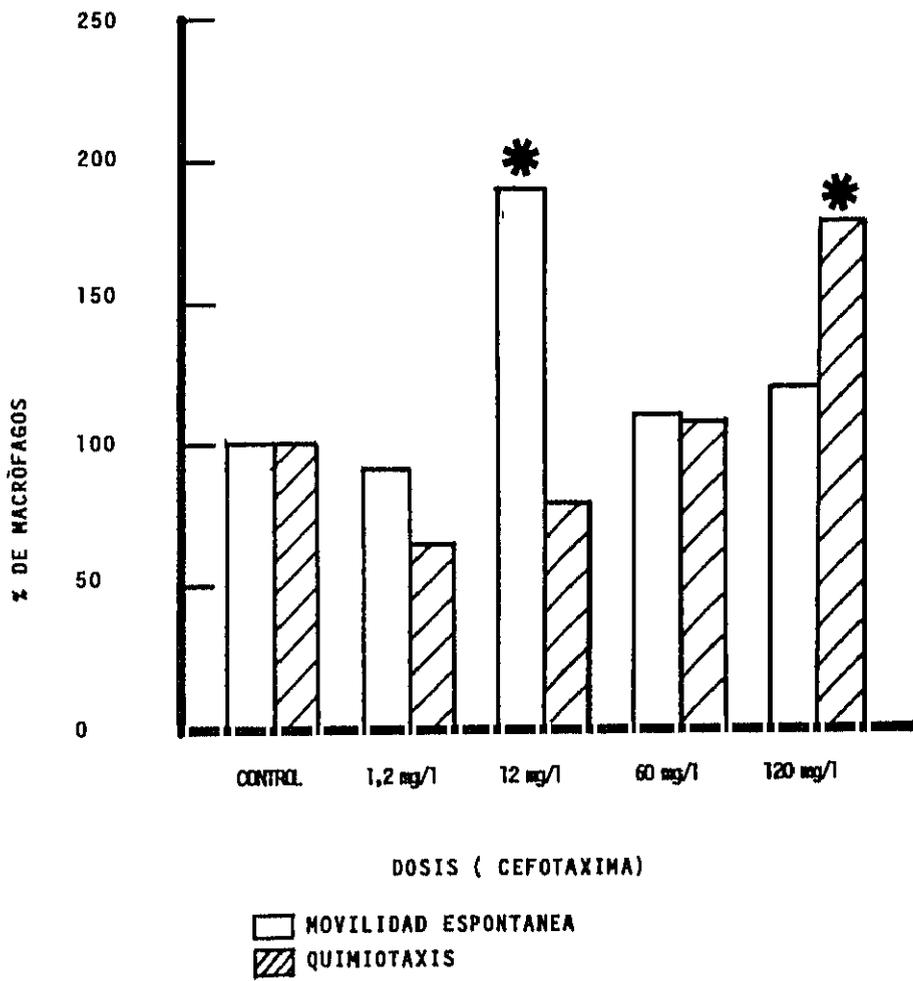


Figura 15. Índice de movilidad espontánea (columnas blancas) y quimiotaxis (columnas rayadas) de macrófagos peritoneales murinos de ratones Balb/c, incubados con netilmicina. Índice representado como porcentaje del valor basal.

Grupos de 7 - 8 ratones.

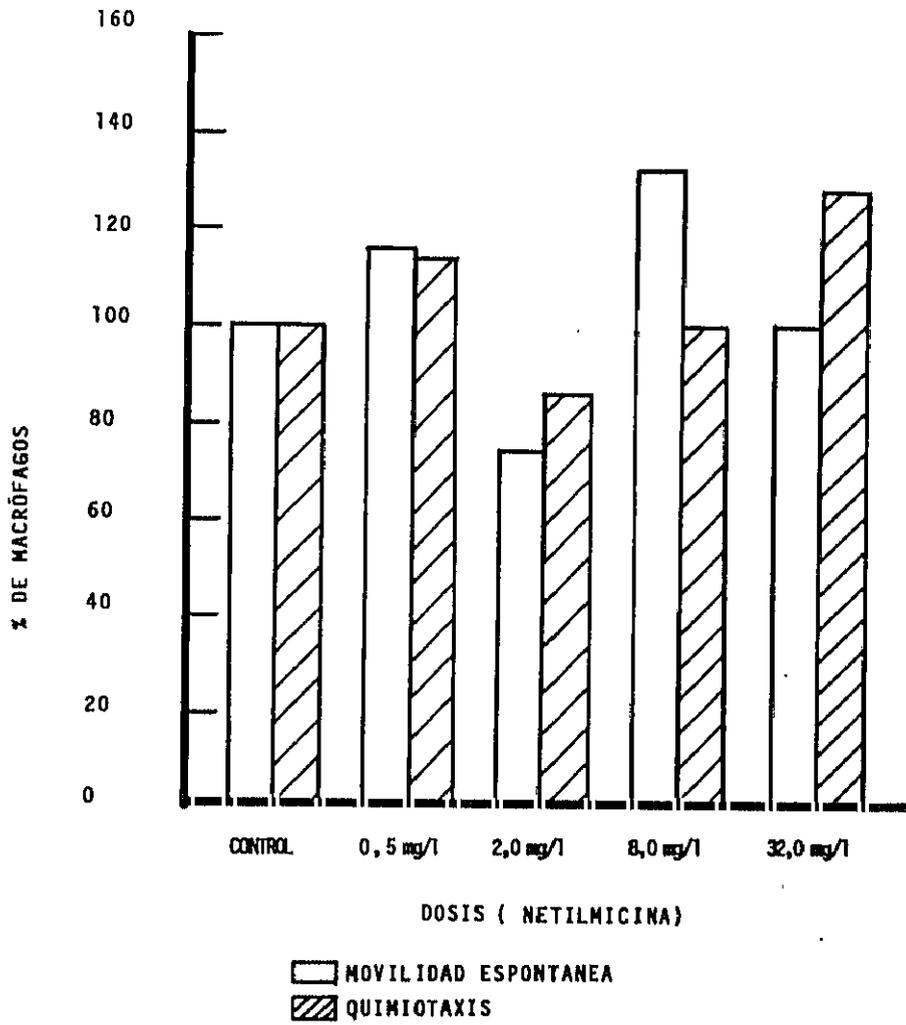


Figura 16. Efecto de la cefotaxima en la capacidad de adherencia y fagocitosis de los macrofagos peritoneales murinos en presencia y ausencia de suero. Cada columna representa el número de candidas adheridas o fagocitadas por 100 macrófagos.

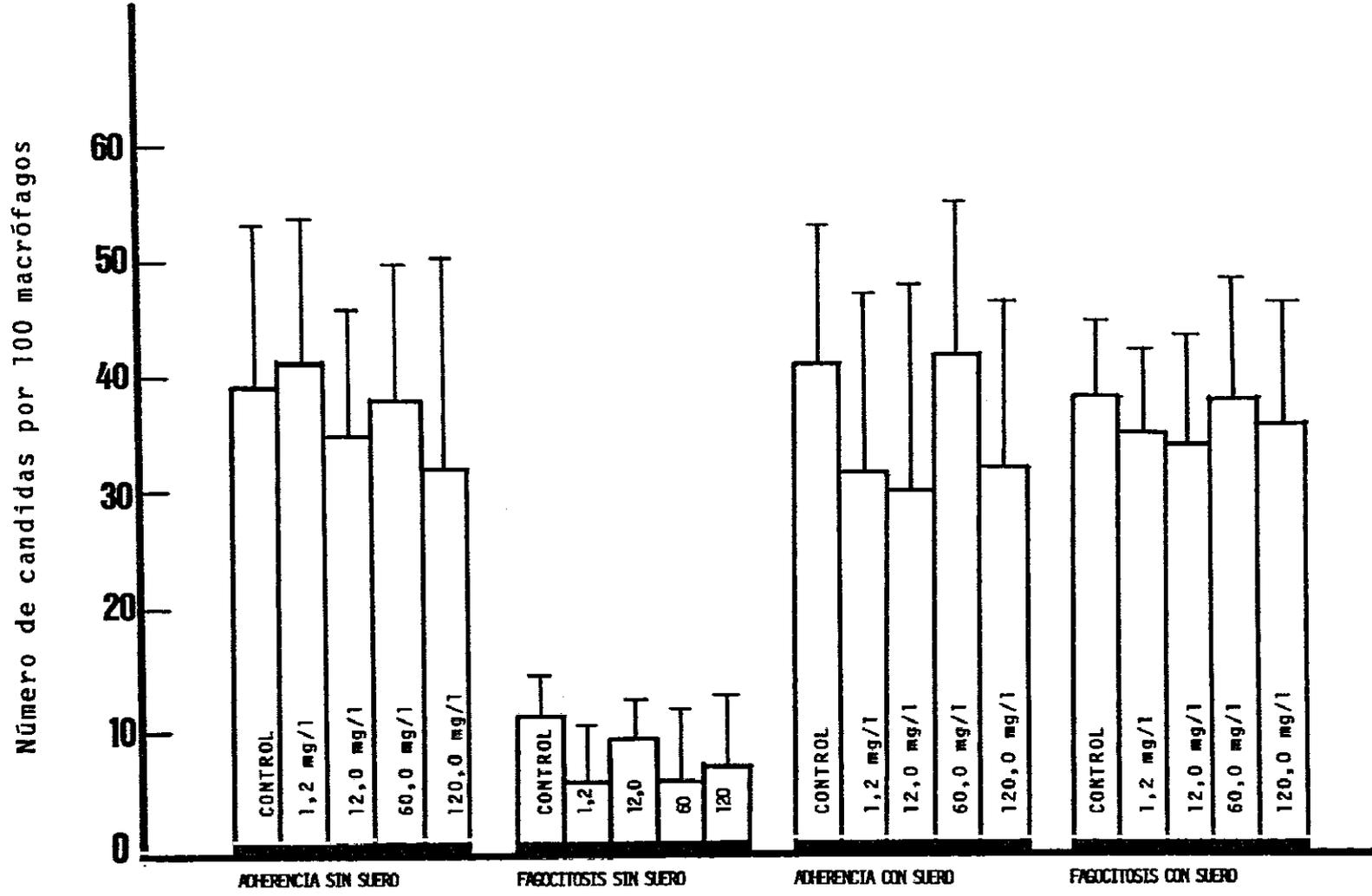


Figura 17. Efecto de la netilmicina en la capacidad de adherencia y fagocitosis de los macrófagos peritoneales murinos en presencia o ausencia de suero. Cada columna representa el número de candidas adheridas o fagocitadas por 100 macrófagos.

Número de candidas por 100 macrófagos

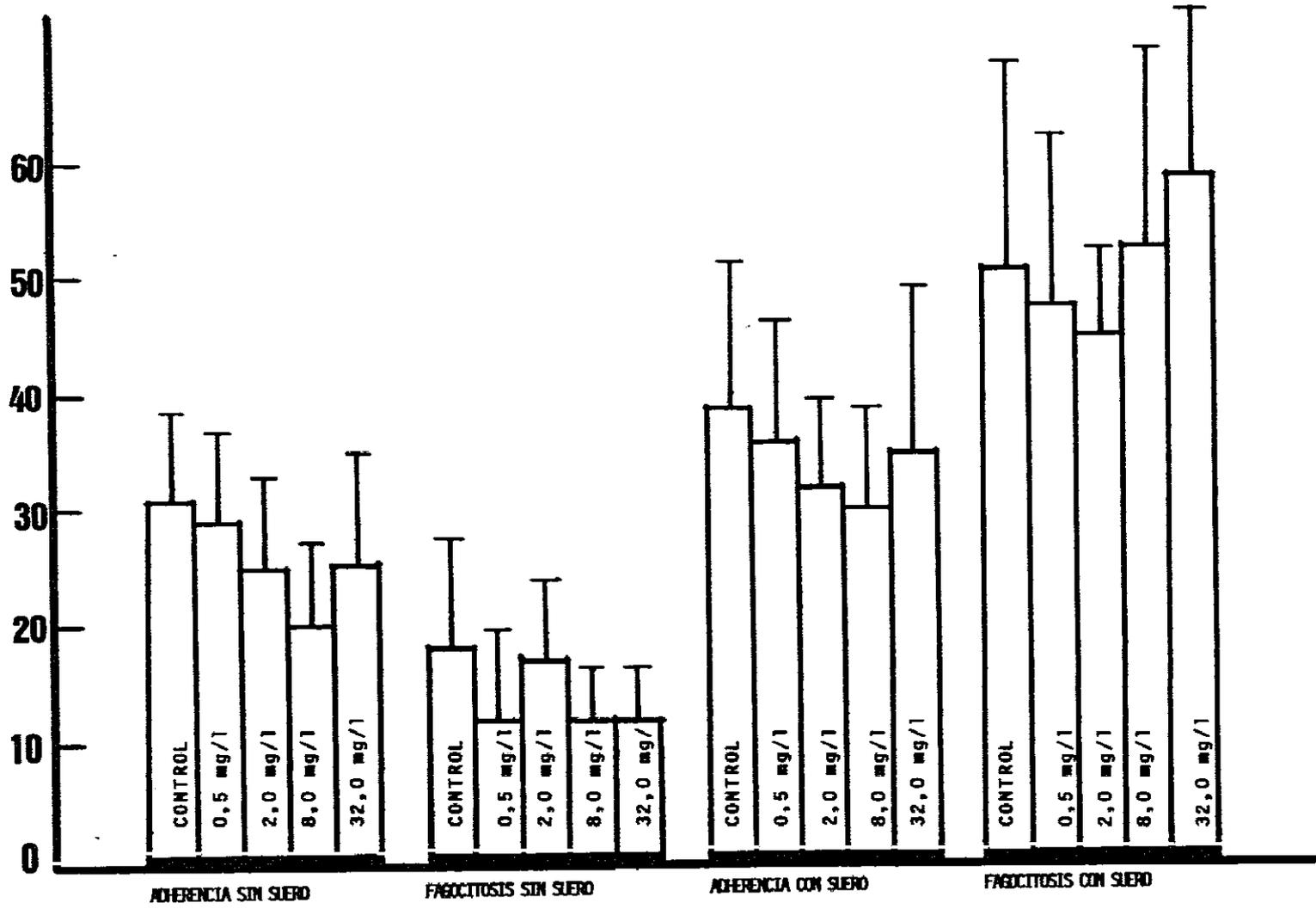


Figura 18. Curva de letalidad de Escherichia coli con 4xCMi de cefotaxima en caldo de Mueller Hinton. Las bacterias se incubaron durante 60 minutos con 4xCMi de cefotaxima ;con el objeto de determinar el tiempo máximo de exposición a la que podía estar sometida la bacteria sin comprometer sensiblemente su viabilidad; cada 15 minutos se tomaron muestras y se procedió a su recuento en placa al día siguiente.

Control (□.) y tratado (■.). Cada punto representa el valor medio de 6 ensayos expresados en Log_{10} ufc/ml.

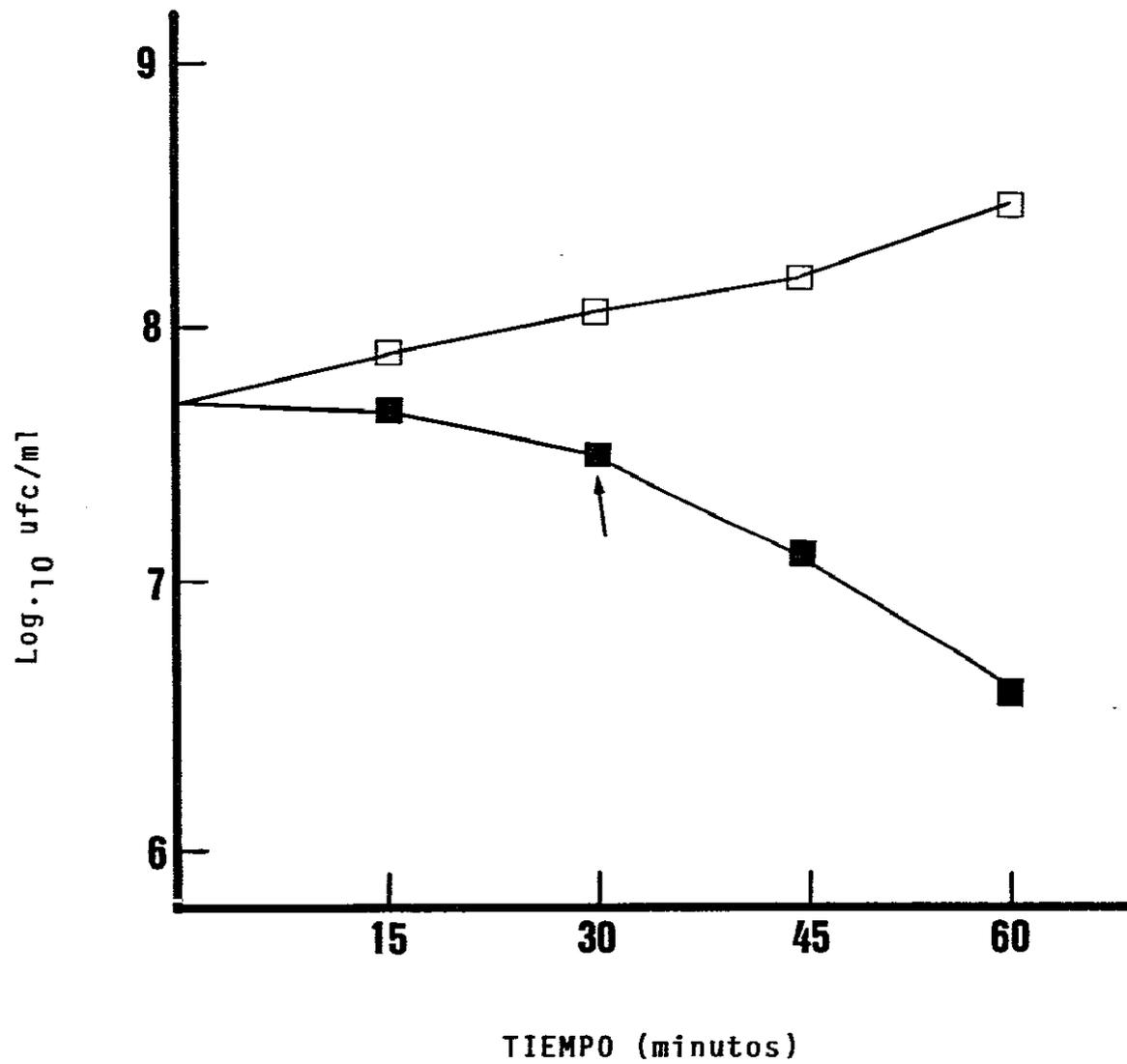


Figura 19. Curva de letalidad de Escherichia coli con 4x CMI de netilmicina en caldo de Mueller Hinton. Las bacterias se incubaron durante 40 minutos con 4x CMI de netilmicina con el objeto de determinar el tiempo máximo de exposición a la que podía estar sometida la bacteria sin comprometer sensiblemente su viabilidad; cada 10 minutos se tomaron muestras y se procedió a su recuento en placa al día siguiente.

Control (Δ) y tratado (\blacktriangle). Cada punto representa el valor medio de 6 ensayos expresados en Log_{10} ufc/ml.

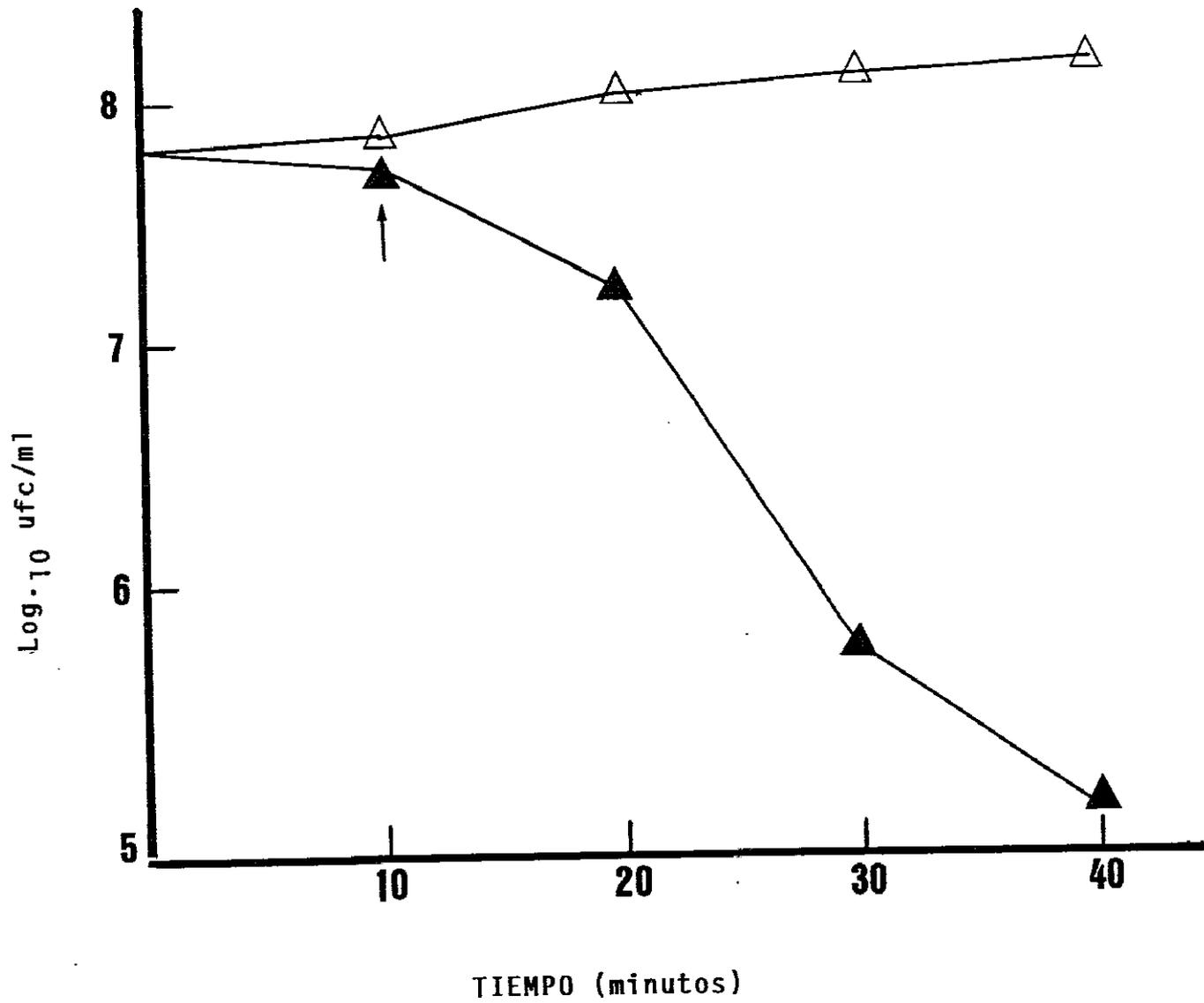


Figura 20. Curva de letalidad de Staphylococcus aureus con 4xCMi de cefotaxima en caldo de Mueller Hinton. Las bacterias se incubaron durante 60 minutos con 4xCMi de cefotaxima con el objeto de determinar el tiempo máximo de exposición a la que podía estar sometida la bacteria sin comprometer sensiblemente su viabilidad; cada 15 minutos se tomaron muestras y se procedió a su recuento en placa al día siguiente.

Control (□) y tratado (■). Cada punto representa el valor medio de 6 ensayos expresados en \log_{10} ufc/ml.

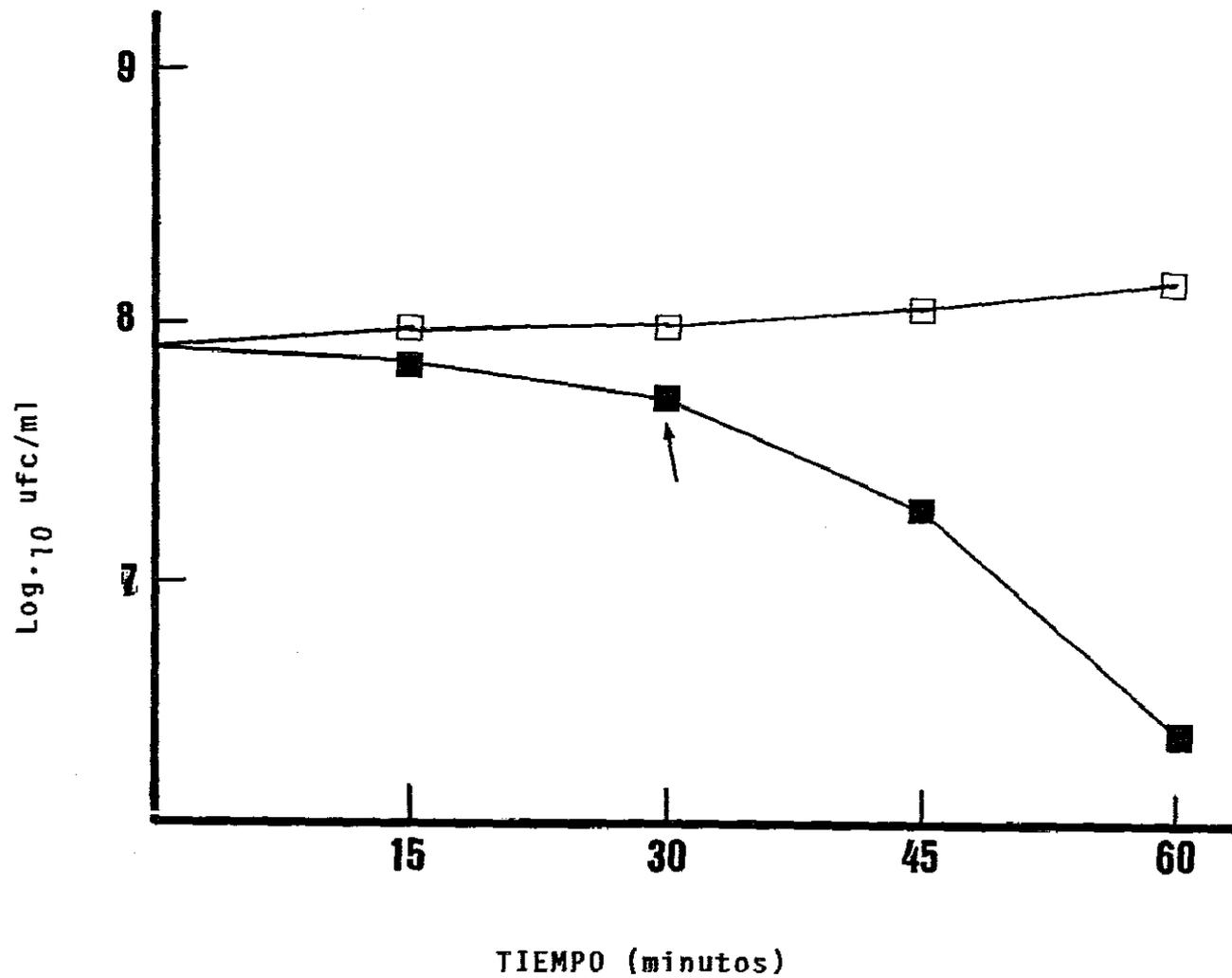


Figura 21. Curvas de letalidad de Staphylococcus aureus con 4xCMi de netilmicina en caldos de Mueller Hinton y Triptona-Soja. Las bacterias se incubaron durante 40 minutos con 4xCMi de netilmicina en dos caldos distintos con el objeto de determinar el tiempo máximo de exposición a la que podía estar sometida la bacteria sin comprometer sensiblemente su viabilidad; cada 10 minutos se tomaron muestras y se procedió a su recuento en placa al día siguiente.

Caldo de Mueller Hinton: control (□.) y tratado (■.), caldo de Triptona-Soja: control (△.) y tratado (▲). Cada punto representa el valor medio de 6 ensayos expresados en Log_{10} ufc/ml.

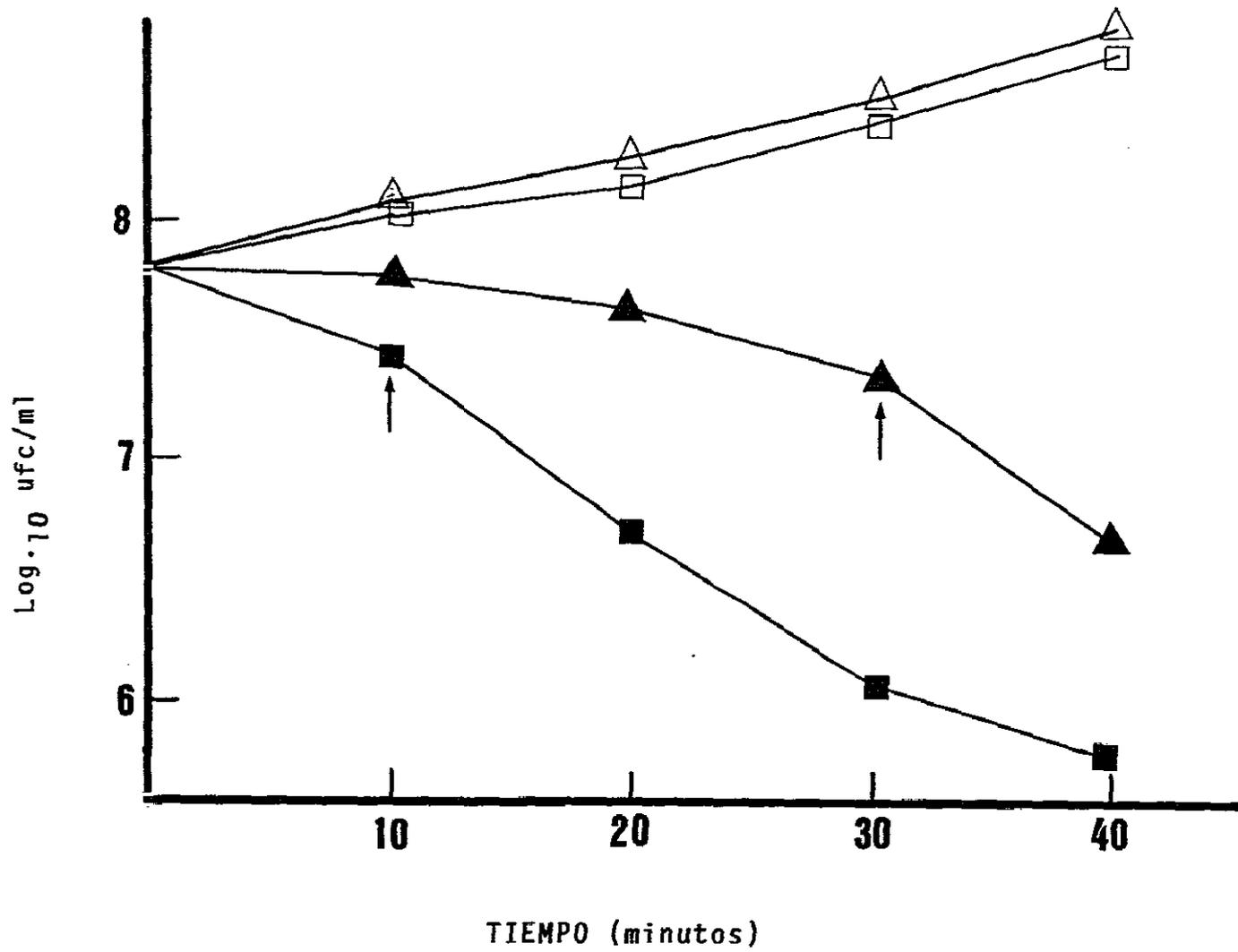


Figura 22. Efecto del incremento de la concentración de fluconazol en el crecimiento de Candida albicans en caldo YNB-Glucosa a pH 7,2 (a) o pH 5,4 (b) con un inóculo de partida de 5×10^3 - 5×10^4 ufc/ml.

Las concentraciones (en mgr/l) fueron: 0,16 (□), 0,8 (▲), 4,0 (■), 20 (★), 100 (✱) y 500 (☆). Control (Δ).

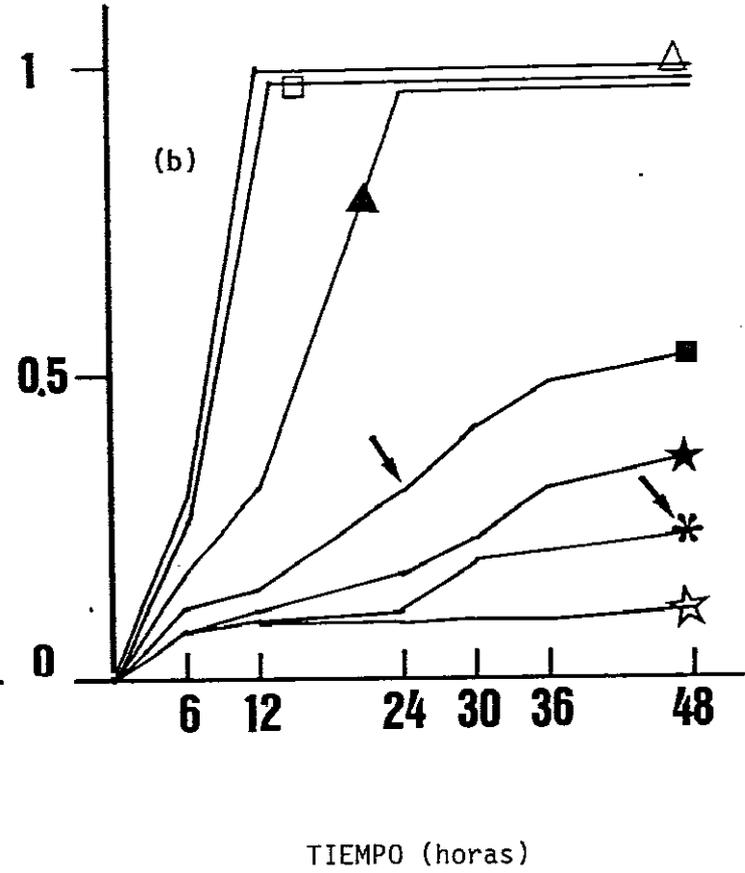
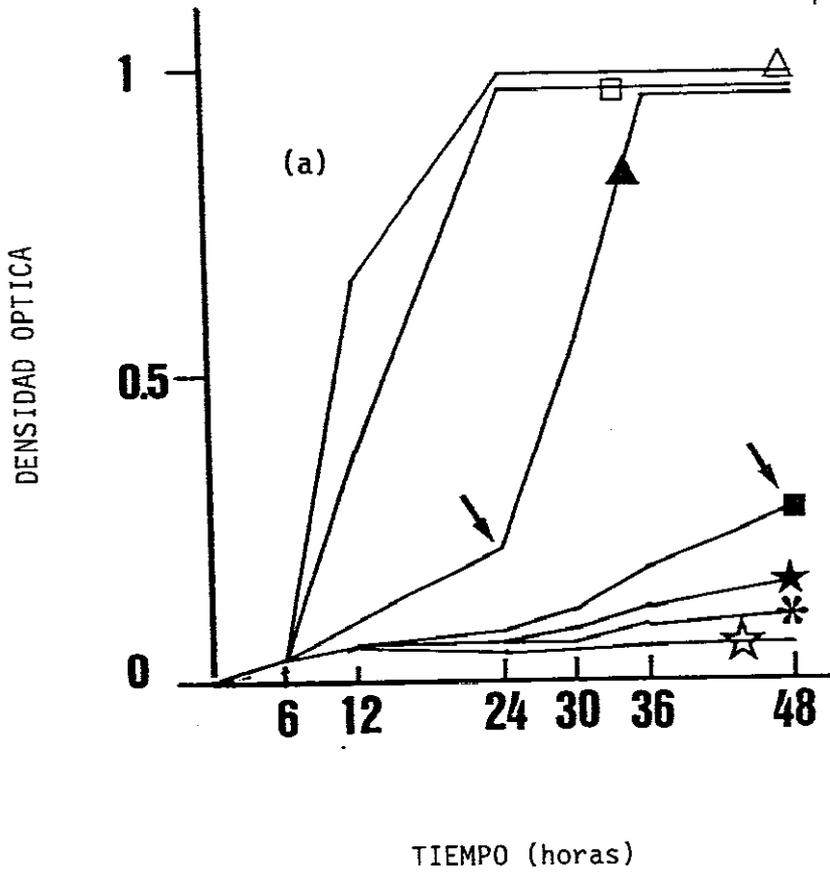


Figura 23. Efecto del incremento de la concentración de fluconazol en el crecimiento de Candida albicans en caldo YNB-Glucosa a pH 7,2 (a) o pH 5,4 (b) con un inóculo de partida de $5 \times 10^6 - 10^7$ ufc/ml.

Las concentraciones (en mgr/l) fueron : 0,16 (□), 0,8 (▲), 4,0 (■), 20 (★), 100 (✱) y 500 (☆). Control (Δ).

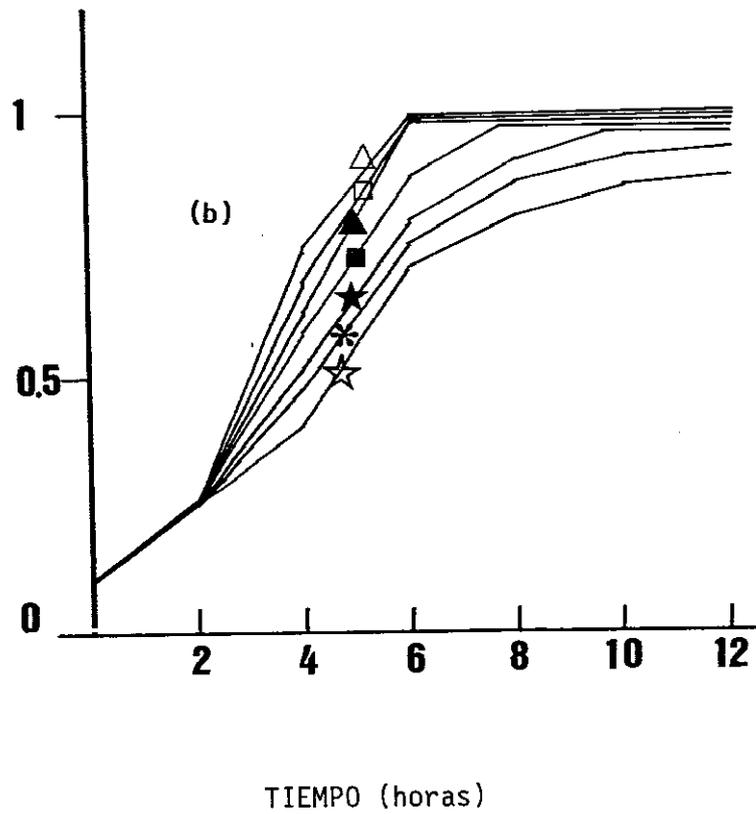
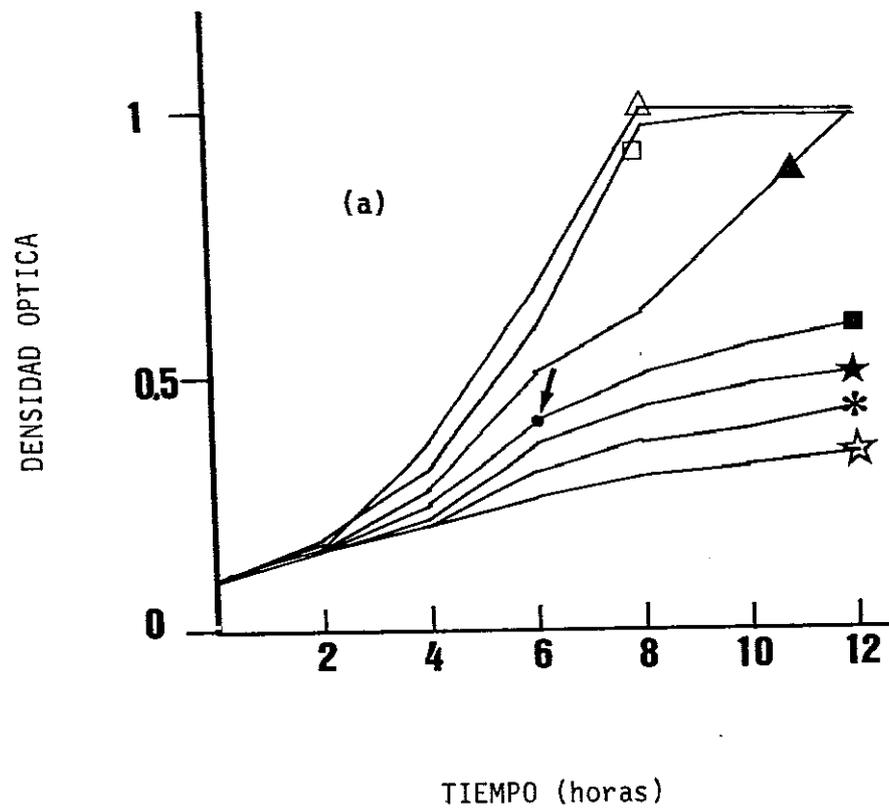


Figura 24. Efecto de la previa exposición de Escherichia coli con cefotaxima en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos en presencia de suero. E.coli se incubó con 4xCMi de cefotaxima durante 30 minutos en caldo de Mueller Hinton seguidamente se eliminó el antibiótico por centrifugación y las bacterias tratadas se resuspendieron en HBSS-gelatina con suero (■) o una mezcla de suero y PMN (*). Para los controles se utilizaron bacterias sin tratar a los que se añadió suero (▲) o suero y PMN (★). Los resultados se representan en Log_{10} ufc/ml como $X \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos.

Variación en la viabilidad de *E. coli*

Log₁₀ ufc/ml

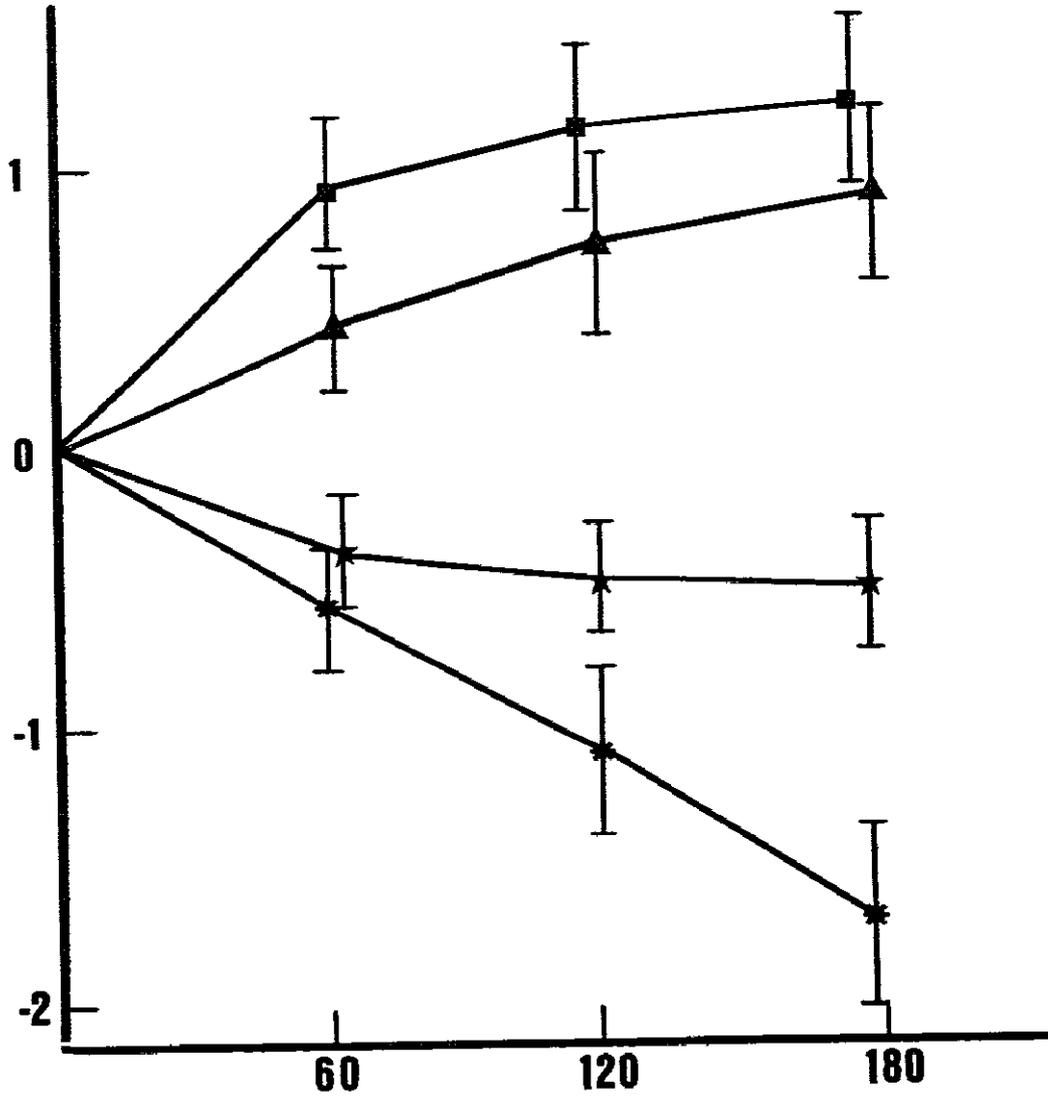


Figura 25. Efecto de la previa exposición de Escherichia coli con netilmicina en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos en presencia de suero. E. coli se incubó con 4xCMi de netilmicina durante 10 minutos en caldo de Mueller Hinton, seguidamente se eliminó el antibiótico por centrifugación y las bacterias tratadas se resuspendieron en HBSS-gelatina con suero (■) o una mezcla de suero y PMN (*). Para los controles se utilizaron bacterias sin tratar a los que se añadió suero (▲) o suero y PMN (★). Los resultados se representan en Log_{10} ufc/ml como $X \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos.

Variación en la viabilidad de *E. coli*

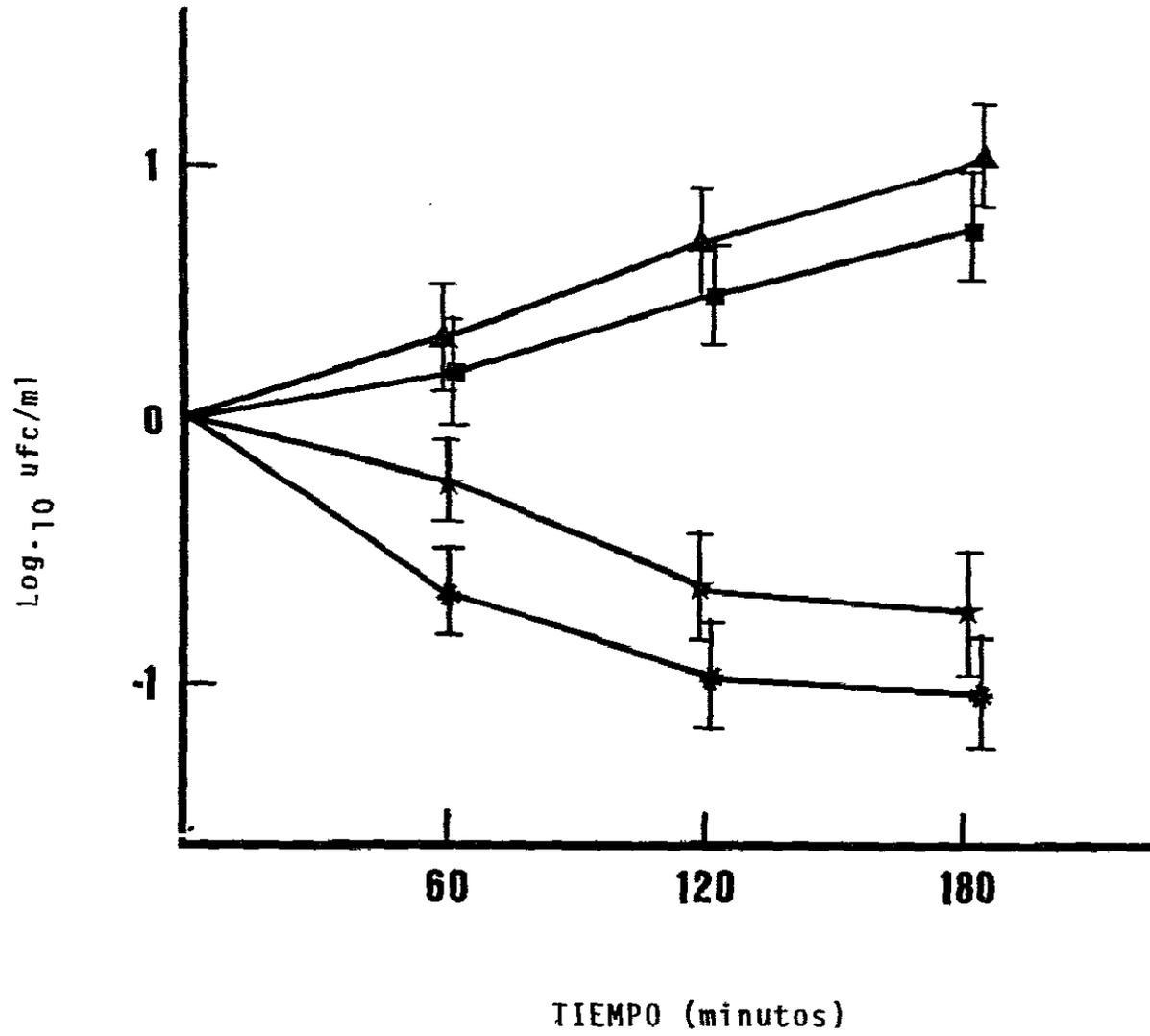


Figura 26. Efecto de la previa exposición de Staphylococcus aureus con cefotaxima en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos en presencia de suero. S. aureus se incubó con 4xCMi de cefotaxima durante 30 minutos en caldo de Mueller Hinton, seguidamente se eliminó el antibiótico por centrifugación y las bacterias tratadas se resuspendieron en HBSS-gelatina con suero (■.) o una mezcla de suero y PMN (*). Para los controles se utilizaron bacterias sin tratar a los que se añadió suero (▲) o suero y PMN (★). Los resultados se representan en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos.

Variación en la viabilidad de S.aureus

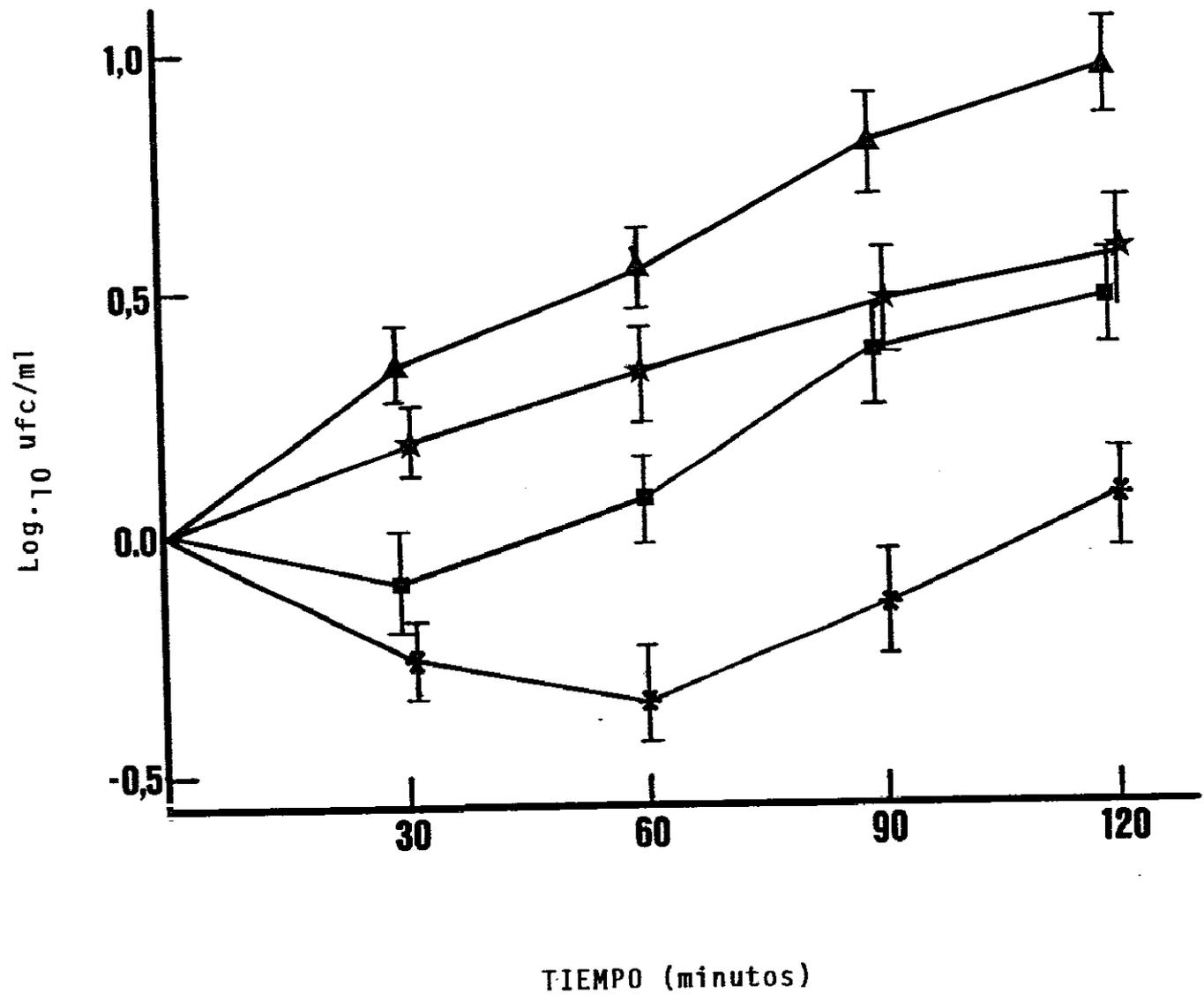


Figura 27. Efecto de la previa exposición de Staphylococcus aureus con netilmicina en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos en presencia de suero. S. aureus se incubó con 4xCMi de netilmicina durante 10 minutos en caldo de Mueller Hinton, seguidamente se eliminó el antibiótico por centrifugación y las bacterias tratadas se resuspendieron en HBSS-gelatina con suero (■) o una mezcla de suero y PMN (*). Para los controles se utilizaron bacterias sin tratar a los que se añadió suero (▲) o suero y PMN (★). Los resultados se representan en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 7 individuos.

Variación en la viabilidad de *S. aureus*

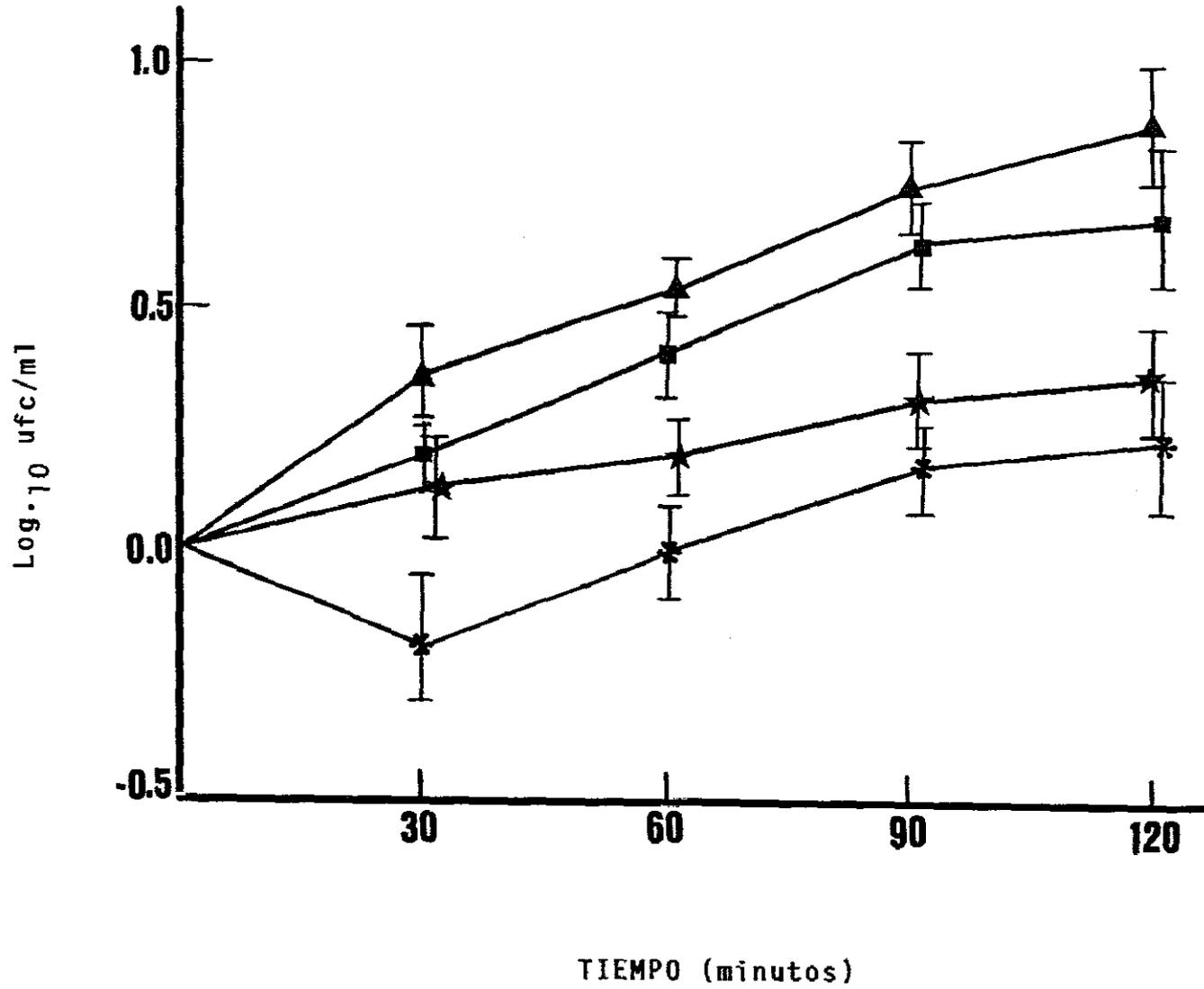


Figura 28. Efecto de la previa exposición de Staphylococcus aureus con netilmicina en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos en presencia de suero. S. aureus se incubó con 4xCMi de netilmicina durante 10 minutos en caldo de Tripton-Soja, seguidamente se eliminó el antibiótico por centrifugación y las bacterias tratadas se resuspendieron en HBSS-gelatina con suero (■) o una mezcla de suero y PMN (*). Para los controles se utilizaron bacterias sin tratar a los que se añadió suero (▲) o suero y PMN (★). Los resultados se representan en Log_{10} ufc/ml como $X \pm \text{SD}$. Grupos de 6 individuos.

Variación en la viabilidad de *S. aureus*

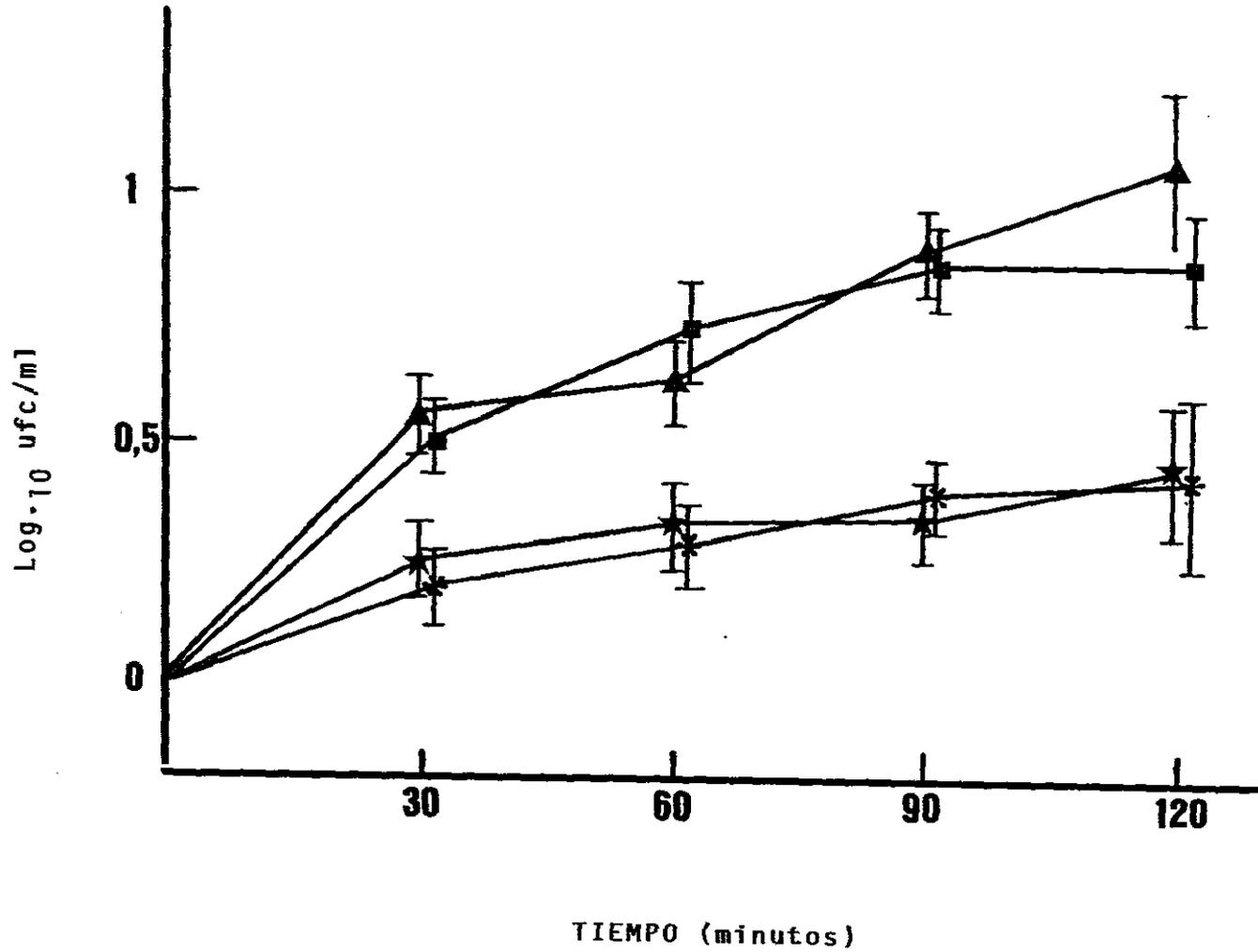
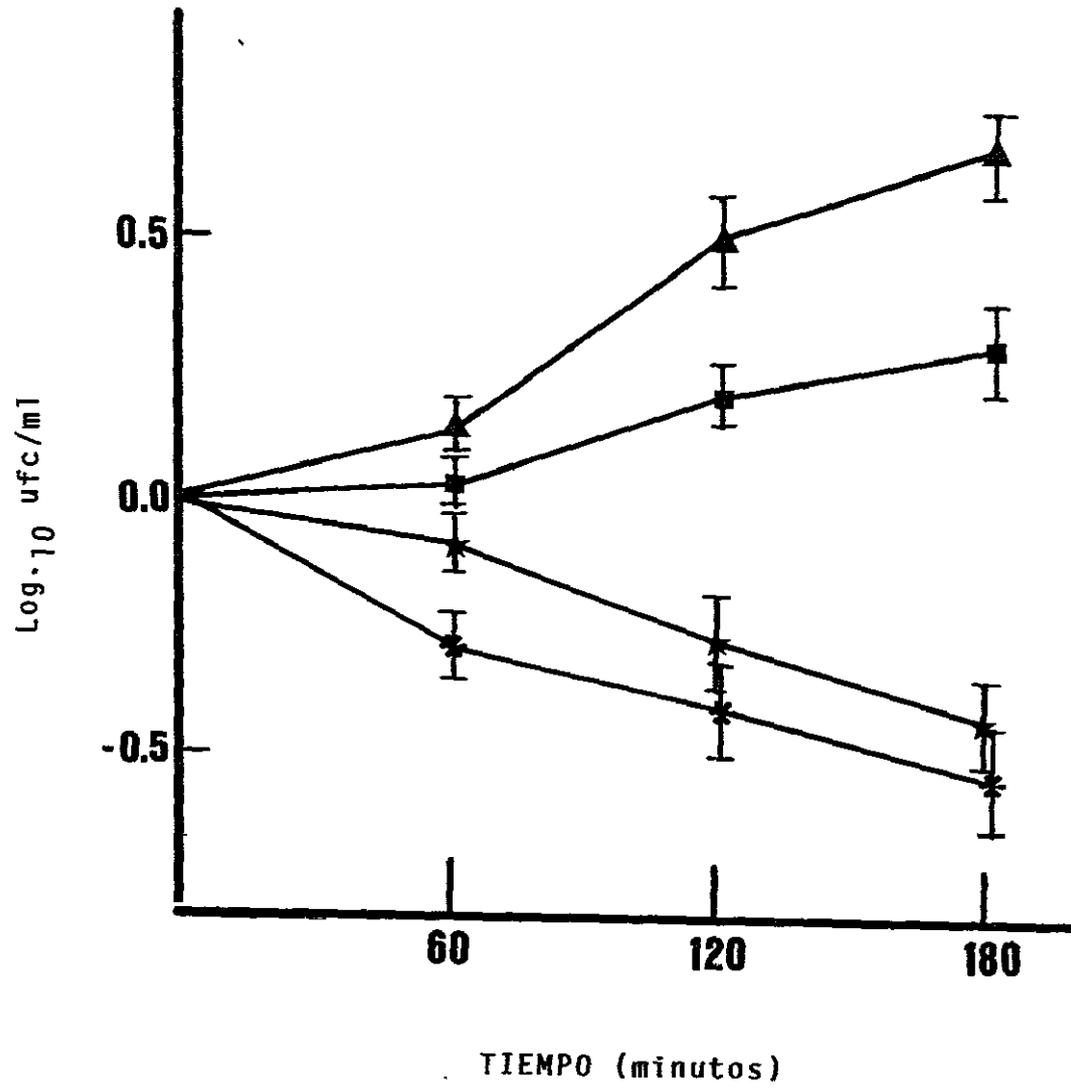


Figura 29. Efecto de la previa exposición de Candida albicans con fluconazol en su cinética de crecimiento así como en su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos en presencia de suero. C. albicans se incubó con 4 mgr/ l de fluconazol durante 6 horas en caldo YNB-Glucosa, seguidamente se eliminó el antifúngico por centrifugación y las candidas tratadas se resuspendieron en HBSS-gelatina con suero (■.) o una mezcla de suero y PMN (.*). Para los controles se utilizaron candidas sin tratar a los que se añadió suero (▲) o suero y PMN (★). Los resultados se expresan en Log_{10} ufc/ml como $\bar{X} \pm \text{SD}$. Grupos de 8 individuos.

Variación en la viabilidad de C. albicans



5.- DISCUSSION

ALGUNOS COMENTARIOS SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA.

La confrontación entre los microorganismos causantes de la infección y los macrófagos ocurre en diferentes tejidos: pulmones, hígado, pleura, peritoneo etc. De estos, el peritoneo es una fuente de células fagocíticas incluso en ausencia de inflamación, accesible y que nos permite contar con un modelo para estudiar los efectos de la quimioterapia en los macrófagos.

Se utilizaron macrófagos de ratones Balb/c porque de un solo animal, mediante lavado peritoneal y sin previa estimulación, podíamos obtener hasta 4×10^6 cel./ml y así realizar una serie de experimentos con una población celular bastante homogénea.

Se eligieron animales jóvenes, de 12 semanas, en los que la adherencia y la capacidad de unión e ingestión de partículas por los macrófagos era mejor, en comparación con los procedentes de ratones más viejos (151).

Empleamos C. albicans por su importancia como agente patógeno oportunista, por otro lado se trata de un microorganismo resistente a los 2 antibióticos empleados, lo que se comprobó viendo su viabilidad con azul de metileno, que era siempre superior al 95%.

Las concentraciones de los antibióticos empleados se obtuvieron de los niveles que se alcanzaron en plasma tras la administración de las dosis estándar.

En la preparación de los PMN no se utilizaron técnicas que emplean dextrano o gradientes de densidad con polímeros, tal como indica un trabajo publicado

por Eggleton, Gargan y Fisher en 1989 (155) son varios los efectos que estos productos pueden producir en los leucocitos, así el dextrano puede inhibir su migración en agarosa, estimular su metabolismo y unirse de forma irreversible a su superficie alterando sus propiedades. El ficoll y el percoll pueden ocasionar una pérdida de su capacidad de adherencia y extensión celular en superficies de plástico y cristal.

Existen también otros efectos relacionados con el grado de pureza de estos polímeros, así se encontraron restos de polisacáridos bacterianos en lotes de ficoll en donde los PMN así aislados presentaban alteraciones morfológicas y funcionales.

Por todo ello nosotros optamos por la técnica de separación por cloruro amónico porque si bien existen estudios que indican una capacidad de interferencia con el balance electrolítico del PMN (155) también se demostró que este efecto era reversible cuando las células se resuspendían en medio fisiológico.

Para obtener una lisis completa de los PMN se utilizó la técnica del agua básica descrita por Gargan y cols. (157), estudios preliminares demostraron que en esas condiciones (pH 11 y 37° de temperatura) se conseguía una lisis total de los PMN sin comprometer la viabilidad bacteriana de E. coli, S. aureus y C. albicans.

EFEECTO DIRECTO DE CEFOTAXIMA Y NETILMICINA SOBRE LAS FUNCIONES IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS.

Los fagocitos (neutrófilos y monocitos) por su capacidad para fagocitar y destruir microorganismos, representan la primera línea de defensa del huésped frente a una invasión bacteriana. Las infecciones de enfermos neutropénicos han puesto en evidencia la importancia de mantener íntegras estas defensas inespecíficas (159).

En la bibliografía hay numerosos trabajos en los que se demuestran como los antimicrobianos pueden interferir con las funciones de los leucocitos polimorfonucleares humanos (160, 161). Así eritromicina, tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol y ciertos aminoglicósidos pueden inhibir la actividad quimiostática de esos granulocitos "in Vivo" (126, 162, 163, 164). También pueden alterar su capacidad bactericida (124, 165, 166).

La falta de conocimientos sobre el macrófago, así como su importancia como célula presentadora de antígenos y secreción de mediadores solubles, nos llevó a seleccionarla en la realización de este trabajo. Para ello se utilizaron un betalactámico (cefotaxima) y un aminoglicósido (netilmicina).

Las funciones del macrófago estudiadas fueron: capacidad de adherencia, movilidad, opsonización y fagocitosis.

La adherencia es una necesidad previa a la diapédesis de las células fagocíticas hacia los tejidos. Ello constituye el primer paso para que acontezca la fagocitosis de los agentes infecciosos. Los macrófagos, después de haberse adheridos a la pared de los vasos, se dirigen al foco de infección, por medio de movimientos espontáneos y a favor de un gradiente de concentración de sustancias quimiotácticas. Dado que estas propiedades pueden ser reproducidas "in Vitro", se analizó si cefotaxima y netilmicina podían afectar a estas funciones.

Ni cefotaxima ni netilmicina alteraron la capacidad de adherencia al plástico de los macrófagos. Estos resultados contrastaron con los obtenidos, con leucocitos polimorfonucleares (PMN), por Rodriguez y cols (167) utilizando cefmetazol, cefotaxima e imipenem. Seklecki y cols. (168) ensayando netilmicina si detectaron un incremento en la adherencia. La explicación de los diferentes resultados obtenidos podría estar en la metodología empleada, ya que estos trabajos se realizaron por el método de adherencia a fibras de nylon descrito por McGregor y cols (169).

En relación con la capacidad de los macrófagos para moverse orientadamente en función de un gradiente, observamos que el mayor valor de los índices quimiotácticos para cefotaxima fué con 120 $\mu\text{g/ml}$; mientras que para la movilidad espontánea fué de 12 $\mu\text{g/ml}$, no encontrándose ningún efecto para el resto de las concentraciones ensayadas.

Los trabajos realizados por otros autores con betalactámicos sobre la movilidad de los PMN humanos indican conclusiones muy dispares; así Fietta y cols.

(131), ensayando con cefotetam, ceftazidima y moxalactam, no encontraron efecto sobre la movilidad espontánea ni sobre la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos, al igual que Belsheim y Gnarpe (170) en la quimiotaxis con cefotaxima o Majeski y cols. (165) con cefamandol. Un grupo de investigadores describieron un efecto potenciador de la quimiotaxis con betalactámicos (167) mientras que otros encontraron un efecto inhibitor con cefotaxima, cefoperazona, moxalactam y cefmetazol (131, 171, 172, 173).

En la exposición previa de los macrófagos a distintas concentraciones de netilmicina, no detectamos ningun efecto destacable ni en la movilidad espontánea ni en la quimiotaxis. Estos resultados confirman los obtenidos por Forsgren y Schmeling (126) con kanamicina y gentamicina y los de Burgaleta y Moreno (172) con amikacina, sisomicina y tobramicina. Sin embargo Seklecki Khan y Goodhart con amikacina, kanamicina, gentamicina, tobramicina y netilmicina hallaron efecto inhibitor de estas funciones en PMN (162, 168, 174).

Las diferencias obtenidas por los investigadores citados, puede radicar en el método empleado ya sea por la técnica de migración en agarosa, descrito por Nelson (175), o por el método de cámara de Boyden (14), tan como parecen indicar los trabajos de Quie (176) y el más reciente de Bignold (177).

Para el reconocimiento del material que va a ser fagocitado, los macrófagos se unen al mismo mediante la opsonización o adherencia inmunológica (178). Esta característica del macrófago, al igual que la adherencia y la movilidad, depende de estructuras de membrana,

pero a pesar de ser una propiedad básicamente estructural resulta necesaria para llevar a cabo la actividad funcional subsiguiente: la fagocitosis.

La opsonización se realiza gracias a la presencia de receptores Fc y C3b del complemento sobre la membrana del macrófago (179); por tanto el estudio de la opsonización en esta célula es una forma de detectar la existencia y de cuantificar el número de receptores indicados.

Los resultados hallados, tras el recuento del número de candidas adheridas en 100 macrófagos, indicaron que ni cefotaxima ni netilmicina estimularon esta capacidad. De igual forma la fagocitosis de Candida albicans por macrófagos peritoneales tampoco se vió afectada, pero si fué fundamental la presencia de suero para incrementar la fagocitosis como indican los resultados. Lehrer y Cline (80) indicaron la necesidad de la presencia de factores termolábiles en el suero necesarias para una adecuada opsonización y consiguiente fagocitosis.

Tras tratar previamente a los leucocitos polimorfonucleares con moxalactam, gentamicina y cefotaxima, Burgaleta y cols. (172, 173) no encontraron efecto alguno ni en la fagocitosis de C. albicans ni en su capacidad microbiciada. Iguales resultados obtuvieron Rodriguez y cols. con cefmetazol (167) y Seklecki y cols. con netilmicina (168).

Ferrari y cols (130) hallaron inhibición de la fagocitosis y muerte de C. albicans en presencia de gentamicina, tobramicina, amikacina, sisomicina

y ribostatina por PMN. El previo tratamiento de macrófagos alveolares con aztreonam y netilmicina no afectó a la fagocitosis de partículas de zimosán (180). Lingaas y Midtvedt observaron una potenciación de la fagocitosis de Escherichia coli por neutrófilos humanos previamente incubados con cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (181).

Resumiendo, podemos decir que es un hecho fisiológico importante el que un antibiótico estimule la movilidad espontánea y la quimiotaxis de los macrófagos, ya que ayudaría a un mayor acúmulo de estas células en los lugares inflamatorios, facilitando además su poder fagocítico y su papel como presentador de antígenos, etapa previa para el desencadenamiento de respuestas inmunes específicas.

EFFECTO INDIRECTO DE CEFOTAXIMA Y NETILMICINA ACTUANDO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE Escherichia coli y Staphylococcus aureus FRENTE A LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS PMN.

La patogenidad en el hombre es dependiente de varios factores; algunos de los cuales son producidos por el mismo microorganismo invasor y los demás están basados en los sistemas de defensa específicos o no específicos del huésped. Esta estrecha relación es la que determinará finalmente si una infección prosperará o no.

En circunstancias excepcionales en la que la cepa invasora posee unas características de virulencia especiales o cuando el huésped está inmunocomprometido, es decir con sus defensas mermadas, esta estrecha relación se puede inclinar finalmente hacia el patógeno. Es aquí donde el conocimiento y el uso adecuado de los antibióticos pueden jugar un papel importante en la recuperación del paciente (81).

Tradicionalmente la actividad de los antibióticos se median en términos de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), pero en la actualidad se sabe que estos antibióticos pueden también inducir cambios morfológicos y metabólicos no letales que pueden llegar a ser determinantes, aumentando la susceptibilidad de los microorganismos patógenos frente a los mecanismos de defensa del huésped.

Así Lorian y De Freitas (182) en 1977 definieron la concentración mínima de antibiótico que puede causar en la bacteria algún cambio morfológico o funcional

repercutiendo en la elaboración de ciertas toxinas, bió-síntesis de enzimas, antígenos de superficie etc... También Parker y cols. (183) y más tarde McDonald y cols. (184) indicaron que los antimicrobianos "in Vitro" podían retrasar el crecimiento bacteriano durante un tiempo mayor al de exposición al antimicrobiano. Todos estos cambios en la bacteria pueden potenciar y favorecer la actividad microbicida de los leucocitos, potenciando su fagocitosis y muerte intracelular (113).

En nuestro trabajo estudiamos este efecto tratando previamente E. coli y S. aureus durante un breve periodo de tiempo con un inhibidor de síntesis de pared como cefotaxima y un inhibidor de síntesis proteica como netilmicina.

Los betalactámicos como cefotaxima suelen ser muy activos frente a la mayoría de los gram-negativos y gram-positivos, lo mismo ocurre con los aminoglicósidos frente a los gram-negativos; si bien estos últimos suelen ser inactivos frente a gran parte de las cepas gram-positivas (excepto Staphylococcus como los S. aureus y S. epidermidis) si suele usarse en la práctica clínica en combinación con betalactámicos (inhibidores de síntesis de pared). Las alteraciones que estos pueden causar en la pared bacteriana favorecen la penetración de los aminoglicósidos en su interior y potencian su acción bactericida (185).

La determinación de las curvas de letalidad para cefotaxima y netilmicina, se realizaron para estimar el tiempo máximo que podían estar E. coli y S. aureus expuestas a la acción del antibiótico sin perder su viabilidad, pero que podían provocarles algún cambio

morfológico o funcional (114). Los resultados nos indicaron 30 minutos para cefotaxima y tan solo 10 para netilmicina (en ambas bacterias). De este último se sabe que posee una acción bactericida muy rápida y que según Weisblum y Davies (186) transcurría en la primera media hora de exposición. La unión del aminoglicósido al ribosoma sería para entonces irreversible y letal.

Con otro inhibidor de síntesis de proteínas como cloranfenicol, Pruul y McDonald (113) comprobaron como con solo un minuto de exposición a altas concentraciones podía ser suficiente para sensibilizar E. coli a los mecanismos microbicidas del leucocito.

El interés por estas cortas exposiciones de antibiótico se deben en parte a que muchos penetran mal en el leucocito y las bacterias una vez fagocitadas pueden quedar así protegidas de la acción del fármaco. Alexander y Good (187) demostraron incubando previamente S. aureus y P. aeruginosa con cloranfenicol, tetraciclina, meticilina, ampicilina, penicilina G, Streptomina y eritromicina antes de la fagocitosis, se aumentaba el porcentaje de muerte intracelular por los PMN. Así la acción de un antibiótico que penetrara poco podría no limitarse solo con las bacterias extracelulares sino que podría comprometer su supervivencia intracelular (bacterias dañadas) tras la ingestión por el leucocito.

La penetración de los betalactámicos en los fagocitos suele ser muy mala, así se vió que la penicilina G era poco o nada penetrante (101, 103, 188). Adinolfi y cols. (189, 190) demostraron que cefmandol a 4 veces su CMI no afectó a la supervivencia de E. coli y S. aureus

fagocitados al igual que el imipenem y la piperacilina. Con cefazolina y cefalexina tampoco Prokesch y cols. (103) obtuvieron mejores resultados.

Los aminoglicósidos mostraron una mejor penetración que los betaláctámicos (103) debido a su mejor liposolubilidad, pero resultaron intracelularmente inactivos (99, 191) al ser sensibles a los cambios de pH.

Los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento tras el previo tratamiento de las bacterias con antibiótico mostraron un comportamiento distinto al control. Así pues el previo tratamiento de E. coli con cefotaxima aceleró su ciclo de división durante la primera hora (104,5 % mas que el control), una posible explicación a este comportamiento podría ser el dado por ciertos betalactámicos que al ejercer su acción a nivel de la pared, uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) ocasionarían una inhibición de la formación del septum con la consiguiente formación de formas filamentosas que se dividirían incrementando rápidamente el número de bacilos después del tratamiento antibiótico.

Este efecto fué muy estudiado con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, mezlocilina, azlocilina y cefsulodina sobre E. coli y P. aeruginosa (108, 192). Algunos autores también hallaron ausencia de retraso en el crecimiento de bacterias gram-negativas al usar diversos betalactámicos como ampicilina (193), cefamandol (194) y cefotaxima (195); en la mayoría de los casos para producir este retraso se necesitaron concentraciones varias veces mayores que la CMI.

Cefotaxima si produjo un retraso en la cinética de crecimiento de S. aureus; su mayor retraso se obtuvo en la primera media hora (129,4% más que el control) donde incluso redujo el inóculo de partida tras la exposición antibiótica.

La diferencia de comportamiento entre E. coli y S. aureus podría estar relacionada con el tiempo requerido por cada microorganismo para sintetizar nuevas enzimas encargadas de la síntesis de la pared. Así por ejemplo las proteínas de bajo peso molecular constituyen el mayor número de PBP en los bacilos pero no en los cocos, también el tiempo requerido para la síntesis de la pared es más corto en bacilos (196).

De esta forma, la breve exposición de E. coli con cefotaxima no detendría del todo, el proceso de división, pero daría lugar a bacilos incompletos y formas filamentosas. En S. aureus el efecto de la exposición podría ser mayor, los cocos también sufrirían una detención de su crecimiento, alteraciones estructurales de su pared y serían más sensibles al trauma ocasionado por los 10 minutos de centrifugación así como a su posterior resuspensión en un medio de incubación menos favorable para su crecimiento (HBSS-gelatina + un 10% de suero); esto explicaría el descenso de viabilidad observado en la primera media hora posterior al previo tratamiento con cefotaxima. El suero no tuvo ningún efecto bactericida apreciable sobre E. coli y S. aureus.

La previa exposición de S. aureus con netilmicina produjo un retraso en su crecimiento de 1 hora alcanzándose su máximo efecto durante la primera media hora (44,2% más que el control) en cambio con E. coli

no se apreció ningún efecto significativo.

Aquí las diferencias de comportamiento entre ambos microorganismos pueden estar en base a la capacidad de recuperación de su síntesis protéica, ya que una breve exposición de S. aureus con netilmicina, podría ser suficiente para bloquear de un modo parcial esta síntesis limitando la biodisponibilidad de ciertas enzimas y proteínas necesarias para su crecimiento (114).

La acción bactericida de los PMN en nuestras experiencias se vió favorecida de diferente manera. Así tras el previo tratamiento de E. coli con cefotaxima se incrementó la acción bactericida de los PMN en las 3 horas siguientes, alcanzando su máximo valor en la última hora (112,8% más que el control). En el tratamiento con S. aureus este efecto perduró durante 2 horas alcanzando su máximo en la segunda media hora (120% más que el control). En los ensayos de E. coli con netilmicina el efecto duró solo 1 hora (62% más que el control) al igual que con S. aureus, aquí además se alcanzó su máximo valor durante la primera media hora (89,4% más que el control).

Existen experiencias similares que obtuvieron los mismos resultados con betalactámicos y aminoglicósidos tanto a concentraciones superiores a la CMI como subinhibitorias.

Así McDonald y cols. (114) hallaron un efecto potenciador de la capacidad bactericida de los PMN al tratar E. coli con concentraciones mayores de la CMI de cefoxitin, amoxicilina, ampicilina y gentamicina durante un durante un corto tiempo de exposición (de 10 a 30 minutos).

Watanabe y cols. (197) consiguieron también este efecto potenciador incubando E. coli durante 2 horas con 1/4 de la CMI de ceftizoxima, Raponi y cols. (198) con 1/2 de la CMI de netilmicina y ceftriaxona, y Gutiérrez y cols. (199) con 1/2 de la CMI de ceftazidima y gentamicina. En un trabajo más reciente publicado por Mandell y Afman (142) tras incubar E. coli durante 1 hora con concentraciones subinhibitorias de cefotaxima, su metabolito desacetilcefotaxima o juntas se consiguió potenciar la capacidad bactericida de los PMN.

En relación con la cinética de crecimiento de S. aureus (previamente tratadas con cefotaxima) en presencia de PMN hay que decir que el efecto bactericida registrado durante la primera media hora no es atribuible a los leucocitos sino más bien al antibiótico, pero después el efecto potenciador si es evidente.

Revisando los trabajos publicados por otros investigadores podemos encontrar conclusiones semejantes con S. aureus y otros betalactámicos como penicilina G, amoxicilina, ampicilina y meticilina donde utilizando concentraciones por encima de la CMI ocasionaron la muerte de S. aureus por PMN (187, 114'). Root y cols. (111) hallaron que S. aureus tratados durante 2 horas con 1/4 de la CMI de penicilina G, fueron más sensibles a la acción de PMN, pero no encontraron este efecto con gentamicina. Cuffini y cols. (201) determinaron el mismo efecto potenciador con ceftazidima, Friedman y cols. (202) con nafcilina, Adinolfi y cols. (190) con imipenen.

Los trabajos con S. aureus y aminoglicósidos son escasos, debido a su poco uso por separado en terapéutica de infecciones por Gram-positivos. Pero

se encontró en Gram-negativos como E. coli donde la exposición con gentamicina fué suficiente para sensibilizarla frente a los mecanismos microbicidas de los PMN (114).

Los mecanismos por los cuales los betalactámicos y los aminoglicósidos favorecen la actividad de los leucocitos no están muy claros, pero parecen estar relacionados con sus diferentes maneras de actuar.

Los betalactámicos actúan a nivel de la pared uniéndose a unas proteínas fijadoras de penicilinas (PBP). De esta manera producen una inhibición de la síntesis de peptidoglicano y de esta forma alteran la estructura de la pared. Este hecho hace también que los antígenos de superficie queden más expuestos, favoreciéndose una adecuada opsonización, principalmente en nuestro caso por el complemento (203) y por consiguiente facilitando la fagocitosis. Según Root y cols. (111) la modificación de la superficie de S. aureus por el previo tratamiento con antibióticos de pared como la penicilina G, aumentaría su sensibilidad a los mecanismos bactericidas no oxidativos de los PMN (enzimas endógenas como la lisozima y ciertas proteasas), como contraposición a los mecanismos de muerte oxidativa (204, 205).

Los betalactámicos también producen alteraciones en los bacilos, así exposiciones por betalactámicos a concentraciones subinhibitorias inducen filamentos en E. coli por una posible inhibición de la D-alanina carboxipeptidasa (108). También pueden aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular favoreciendo su reconocimiento (115, 206). Hay reducción de componentes

para la síntesis de cápsula con la consiguiente exposición de antígenos ocultos (114, 207). Kudurugawa y cols. (118) observaron en las cefalosporinas un efecto inhibidor sobre la capacidad de retención de hierro por parte de las bacterias, requerimiento esencial para su metabolismo y que de una forma indirecta puede alterar la síntesis de su cápsula.

En el caso de los aminoglicósidos estos actúan a nivel del ribosoma uniéndose a la subunidad 30S y así pueden interferir en la síntesis de proteínas, tales como la proteína A de la pared de S. aureus (208) cuya función es impedir la opsonización (antifagocitaria), y otras enzimas que a su vez podrían comprometer la síntesis de peptidoglicanos de forma que sus ensamblajes en la pared resultaran defectuosas generando anomalías (209). Todo ello finalmente, puede repercutir en una mejor opsonización y por tanto en un aumento de la fagocitosis (210).

Veringa y cols. (211) demostraron que la inhibición de la síntesis de proteína A de S. aureus por un inhibidor ribosómico como clindamicina aumentaba sensiblemente su tasa de fagocitosis por PMN.

En bacilos Gram-negativos Lida y Koike (212) hallaron alteraciones en la estructura de la pared a altas concentraciones de antibiótico. Los aminoglicósidos producen alteraciones de la síntesis proteica con la consiguiente producción de proteínas extrañas (114) y disminución del material antifagocitario (199, 213).

Diferentes medios de incubación pueden mostrar efectos distintos en la bacteria tratada con el

antibiótico. Así el previo tratamiento de S. aureus durante 10 minutos con 4 veces la CMI de netilmicina en caldo de Müller-Hinton (M-H) en nuestro experimento ocasionó un aumento de sensibilidad a los PMN mientras que con caldo de Triptona-Soja (T-S) no se apreció ningún efecto. Esto también quedó reflejado en las curvas de letalidad donde el tiempo máximo de exposición antes de que empezara el descenso de viabilidad con M-H era de 10 minutos mientras que con T-S se alargó hasta los 30 minutos.

Es bastante conocido el poder nutritivo del caldo Triptona-Soja así como su poder de resucitación de esporas previamente calentadas (214). Por todo ello creemos que este medio es más favorable para S. aureus y le permite soportar mejor durante un periodo de tiempo relativamente más largo, el efecto del antibiótico. No se ha demostrado pero pensamos que con un periodo de exposición más largo, obtendríamos efectos parecidos al experimento con Müller-Hinton.

Otros investigadores encontraron otros efectos de los medios de incubación utilizados para la previa exposición de bacterias con antibióticos; así con S. aureus previamente tratado con trimetoprim en caldo de Triptona-Soja no se detectó ningún retraso en su crecimiento normal, pero sí con caldo de Müller-Hinton. En este caso, parece que la mayor concentración de timidina en el caldo de T-S inhibió la acción del trimetoprim (215). Wilson y Rolinson (200) no vieron diferencias en el retraso de crecimiento de S. aureus previamente tratadas con penicilina G en caldo nutritivo o en infusión de cerebro y corazón.

Para concluir diremos que la exposición de E. coli y S. aureus a cefotaxima y netilmicina durante un corto

período de tiempo a concentración superinhibitoria es suficiente para producir en las bacterias alteraciones morfológicas y funcionales que pueden retrasar sus crecimientos normales (excepto E. coli con cefotaxima); y lo que es más importante, los hacen más sensibles a los mecanismos microbicidas de los PMN. Por consiguiente, aunque no puedan tener una buena penetración y actividad intracelular, si pueden de una forma indirecta colaborar a la erradicación del patógeno; máxime en aquellos paciente donde ya sea por la edad, drogadicción, postoperatorios, sida etc; tengan sus mecanismos de defensa debilitados.

EFFECTO INDIRECTO DE FLUCONAZOL ACTUANDO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE Candida albicans FRENTE A LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS PMN.

En comparación con los agentes antibióticos, los avances en fármacos para el tratamiento de infecciones por hongos son más recientes. La anfotericina B es el principal antifúngico que se utilizó en los años 50, mientras que las sulfamidas ya se utilizaban en los 30, así no es de extrañar que en este campo se lleve un retraso de 20 años.

En la actualidad se ha detectado un aumento de las infecciones por hongos oportunistas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (216, 217, 218, 219). Además los hongos que antes se consideraban colonizadores inofensivos ahora se han transformado en patógenos y algunos de ellos son resistentes a varios antifúngicos (220, 221, 222). Ello ha hecho que se promoviera la producción de fármacos nuevos más efectivos; y también que aumentara la necesidad de realizar pruebas de susceptibilidad "in Vitro" para informar a los clínicos cuales son los tratamientos más adecuados.

El fluconazol pertenece a la familia de los azoles (triazoles), es un antifúngico oralmente activo y desde hace poco, aprobado por la administración de sanidad americana para el tratamiento de candidiasis y meningitis por criptococos en pacientes con sida. Las ventajas del fluconazol son su gran solubilidad, baja unión a proteínas, alta biodisponibilidad, larga vida media, estabilidad metabólica (150) y buena penetración en el líquido cefalomaquídeo (LCR) (223, 224).

El primer problema que presentan los antifúngicos es la falta de reproductibilidad encontrada en las pruebas de susceptibilidad. Esto quedó patente en los trabajos de varios grupos de investigadores, que estudiaron una gran variedad de fármacos como la anfotericina B, flucitosina, ketoconazol y fluconazol (225, 226, 227, 228). Existen varios factores que pueden afectar los resultados de las pruebas de susceptibilidad; tales como el medio de incubación (229, 230, 231, 232, 233, 234, 235), pH del medio (229, 231, 235, 236), tiempo de lectura de los resultados y tamaño del inóculo (158, 225, 237, 238).

En nuestro estudio se ha valorado la susceptibilidad del fluconazol para Candida albicans por el método de macrodilución en caldo YNB con un 1% de glucosa y tamponado para evitar los efectos negativos del cambio de pH (239, 240).

La determinación de la CMI y la CI_{50} (227) se realizó en dos pH, uno a 5,4 y otro a pH neutro. De estos resultados obtenidos se observó un efecto importante del pH, así a las 24 horas a pH 5,4 la CMI fué igual a 20 ug/ml y la CI_{50} de 4 ug/ml, mientras que a pH 7,2 la CMI y la CI_{50} fueron iguales a 0,8 ug/ml. A las 48 horas, a pH 5,4, la CMI y la CI_{50} fueron de 100 ug/ml, mientras que a pH 7,2 la CMI y la CI_{50} eran de 4 ug/ml. El efecto del pH tiene una estrecha relación con el ciclo de división, y la cándida crecía mejor a pH 5,4. El cambio de valores de las CMI y CI_{50} en el tiempo se debe a que los azoles tienen una tasa fungistático/fungicida alta a concentraciones terapéuticas (241).

Estos resultados coinciden con los de Van't Wout y cols. (242) quienes determinaron la CMI a pH neutro en 0,8 $\mu\text{g/ml}$, o los de Cook y cols. (228). Por contra McIntyre y cols. (227) determinaron una CMI y una CI_{50} algo menor, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, a las 24 horas pero en un medio para hongos con aminoácidos. Anaissie y cols. (243) encontraron una CMI de 0,25 $\mu\text{g/ml}$.

Todo esto no hace más que remarcar el problema antes mencionado y que en el caso de los azoles se agrava más. Pese a todo, las CMI y CI_{50} se encuentran dentro de las concentraciones terapéuticas que se pueden obtener en sangre, tejidos humanos y animales de experimentación (149, 227, 244, 245).

La discrepancia entre la eficacia "in Vivo" de los azoles como el fluconazol frente a candidiasis diseminadas en ratones granulocitopénicos (246, 247, 248) y su limitada actividad "in Vitro" demostrada en curvas de letalidad nos hizo pensar en un posible efecto cooperativo de estos antifúngicos con los mecanismos de defensa del huésped (228, 246, 262).

Al intentar valorar la sensibilidad de C. albicans, previamente tratadas con fluconazol, a la acción fungicida de PMN, nos encontrábamos con dos problemas; primero, se necesitaba un tamaño de inóculo superior al utilizado en pruebas de susceptibilidad (10^6 ufc/ml frente a 10^4 ufc/ml) y puesto que había un fuerte efecto inóculo (226) tuvimos que realizar una segunda prueba de susceptibilidad determinando una nueva CI_{50} y un tiempo de exposición adecuado. Como no se puede hallar ninguna para ese inóculo, se calculó la CI_{25} (concentración

mínima que redujo el crecimiento de C. albicans una cuarta parte respecto a su control). El resultado final fué una CI_{25} de 4 $\mu\text{g/ml}$ durante 6 horas, una concentración y un tiempo que se pueden alcanzar en secreciones vaginales (254), en esputo (253), en el fluido cerebroespinal (224), tejidos vaginales (251) o en orina y suero (250, 255).

El otro problema era la tendencia que tenía C. albicans a formar filamentos en presencia de suero (264, 265). Así Lehrer y cols. (80) demostraron que cuando se incubaba C. albicans con suero, después de 4 horas los organismos crecían en fase miceliar y podían alterar de forma engañosa el número de unidades viables en un recuento en placa, así si una sola célula de una cadena miceliar sobrevive a la fagocitosis podía formar una colonia y ocultar el hecho de que otras células habían sido destruidas por los PMN.

Llegados a este punto tampoco podíamos prescindir del suero en nuestro experimento ya que son indispensables sus factores para una fagocitosis efectiva, de esta manera se fijó el tiempo de incubación de candidas (previamente tratadas con fluconazol) con los PMN en 3 horas. De inmediato se observó retraso en el crecimiento de C. albicans previamente tratadas con fluconazol y en ausencia de PMN. Este efecto se atribuyó al antifúngico ya que el suero a un 10% no tuvo ningún efecto fungicida apreciable.

El principal mecanismo de acción del fluconazol es la inhibición de la síntesis de ergosterol, que es el mayor esterol encontrado en membranas de hongos y levaduras. Su inhibición puede tener numerosos efectos

sobre la actividad de las enzimas de membrana (148, 256, 257). Se cree que todos los triazoles podrían tener un modo de acción más directo sobre los fosfolípidos de membrana. También podrían inhibir la oxidación del citocromo C y las enzimas peroxidasas, provocando por tanto un aumento en la generación de peróxidos intracelulares (258, 259, 260).

La interacción del fluconazol con los mecanismos de defensa del huésped Van't Wout y cols. (242) tratando con fluconazol (2,5 a 20 mg/kg) ratones infectados con C. albicans, normales y neutropénicos, no hallaron diferencias en su efectividad, Abruzzo y cols. (140) incubando PMN con fluconazol encontraron un descenso en la producción de quimiluminiscencia; mientras que Roilides y cols. (141) no determinaron ningún efecto de interferencia del fluconazol sobre las funciones de los PMN al igual que Senior y Shaw (261). Van Etten y cols. (262) estudiaron el efecto intracelular de fluconazol en macrófagos infectados por C. albicans y no detectaron ningún efecto pese a que ese triazol tenía una buena penetración intracelular (263), ni tan siquiera el previo tratamiento de C. albicans durante 30 minutos aumentó la actividad intracelular posterior.

En nuestro estudio sí se vió un efecto potenciador de la sensibilidad de C. albicans a la acción bactericida de los PMN. Este duró una hora después de un previo tratamiento con 4 ug/ml de fluconazol durante 6 horas. Hubo un aumento del 43,8 % con respecto a su control.

Una posible explicación puede ser que C. albicans tras el tratamiento con fluconazol sufre alteraciones morfológicas y funcionales (ya comentado) y pueden ser más fácilmente opsonizados y fagocitados por los PMN;

ya en su interior serían destruidos por la Mieloperoxidasa, una enzima lisosomal (252), produciéndose un aumento del consumo de oxígeno y generación de peróxidos de hidrogeno (252, 266).

Estos hechos podrían explicar, en parte, las diferencias de efecto entre las pruebas de susceptibilidad "in Vitro" y los resultados terapéuticos reales.

6.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

A/ Los macrófagos son una parte importante en el sistema de defensa del huésped, son necesarios para el buen desarrollo de la respuesta inmune específica. Por todo ello, estudiamos el efecto que podían tener cefotaxima y netilmicina sobre sus funciones básicas obteniendo las siguientes conclusiones:

1.A- Ni cefotaxima ni netilmicina afectan significativamente la adherencia de los macrófagos a placas MIF.

2.A- La quimiotaxis y la movilidad espontánea de los macrófagos no se ven modificadas por netilmicina. Cefotaxima potenció la movilidad espontánea y la quimiotaxis a las dosis terapéutica y sobreterapéutica respectivamente.

3.A- Cefotaxima y netilmicina no afectaron la adhesión de los macrófagos a las candidas, ni su posterior fagocitosis; independientemente de que se usaran candidas previamente opsonizadas con suero o no.

B/ Los leucocitos polimorfonucleares son los fagocitos profesionales por excelencia. En esta parte del trabajo se realizó un estudio del efecto que podían producir cortas exposiciones de cefotaxima y netilmicina (30 y 10 minutos respectivamente) a concentraciones sobreinhibitorias (4 veces la CMI) sobre las cinéticas de crecimiento de Escherichia coli y Staphylococcus aureus en presencia o ausencia de PMN. Con fluconazol se estudió este mismo efecto sobre Candida albicans pero usando una larga exposición a concentración terapéutica. Se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1.B- El pretratamiento de E. coli con cefotaxima aumentó su ciclo de división en la primera hora posterior al tratamiento mientras que en S.aureus retrasó su crecimiento en las dos primeras horas.

2.B- Cefotaxima incrementó la susceptibilidad de E. coli a los mecanismos microbicidas de los PMN durante las 3 horas siguientes al tratamiento mientras que en S. aureus fué durante 2 horas.

3.B- Netilmicina no afectó al crecimiento de E. coli pero sí aumentó su sensibilidad a la acción de los PMN durante la primera hora.

4.B- El medio de incubación tuvo un papel relevante en el tratamiento de S. aureus con netilmicina, así, en caldo de Müeller-Hinton se observó un retraso de crecimiento y un aumento de susceptibilidad a la acción microbicida de los PMN durante la primera hora posterior al tratamiento mientras que en caldo Triptona-Soja la breve exposición antibiótica no tuvo ningún efecto.

5.B- La exposición de C. albicans con 4 mg/l de fluconazol durante 6 horas produjo un retraso en su crecimiento durante las 3 horas posteriores al tratamiento y aumentó su susceptibilidad a la acción de los PMN durante la primera hora.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- MANDELL, L.A. "Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of polymorphonuclear leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 4: 683-697. 1982.
- 2.- HAUSER, W.E; REMINGTON, J.S. "Effect of antibiotics on the response". *Am. J. Med.* 72: 711-716. 1982.
- 3.- ROITT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. "Immunology". Gower Medical Publishing. MEDSI. London 1986.
- 4.- METCHNIKOFF, E. "Immunity in infective diseases". Translated by F.G. Binnie, London Cambridge University Press, 1905.
- 5.- WESLEY, J; ALEXANDER, J.W; GOOD, R.A. "Los fagocitos monoculares". En: "Principios de inmunología clínica". Ed. Reverté. Barcelona. 1980.
- 6.- WESLEY, J; ALEXANDER, J.W; GOOD, R.A. "Los granulocitos". En: "Principios de inmunología clínica". Ed. Reverté. Barcelona. 1980.
- 7.- ANDERSON, D.C; MILLER, L.J; SCHMALSTIEG, F.C; ROTHLEIN, R; SPRINGER, T.A. "Contribution MAC-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte function: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies". *J. Immunol.* 137: 15-27. 1986.
- 8.- HARLAN, J.M; KILLEN, P.D; SENECA, F.M. et al. "The role of neutrophil membrane glycoprotein GP-150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro". *Blood.* 66: 167-178. 1985.
- 9.- LEWINSOHN, D.M; BARGATZE, R.F; BUTCHER, E.C. "Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes". *J. Immunol.* 138: 4313-4321. 1987.
- 10.- MCGUILLEN, J; PATTERSON, R; PHAIR, J.P. "Adherence of polymorphonuclear leukocytes to nylon: modulation by prostacyclin (PGI₂), corticosteroids, and complement activation". *J. Infect. Dis.* 141: 382-388. 1980.

- 11.- CLINE, M.J. "Metabolism of the circulating leukocyte". *Physiol. Rev.* 45: 674-720. 1965.
- 12.- WARD, P.A; LEPOW, I.H; NEWMAN, L.J. "Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes". *Amer. J. Pathol.* 52: 725-736. 1968.
- 13.- SNYDERMAN, R; FUDMAN, E.J. "Demonstration of chemotactic factor receptor on macrophages". *J. Immunol.* 124:2754. 1980.
- 14.- BOYDEN, J. "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes". *J. Exp. Med.* 115: 453-466. 1962.
- 15.- CHENOWETH, D.E; ERIKSON, B.W; HUGLI, T.E. "Human C5a-related synthetic peptides as neutrophil chemotactic factors". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86:227. 1979.
- 16.- PALMBLAD, J. "Leukotrienes and granulocytes. A review". En: "The biology of phagocytes in health and disease". p. 357-365. C. MAURI, S.C. RIZZO y G. RICEVUTI (ed). Pergamon Press, Oxford. N.Y. 1987.
- 17.- SNYDERMAN, R; MEADOWS, L; AMOS, D.B. "Characterization of human chemotactic lymphokine production induced by mitogens and mixed leukocyte reactions using a new microassay". *Cell. Immunol.* 30: 225. 1977.
- 18.- YOSHIMURA, T; MATSUSHIMA, K; OPPENHEIN, J.J; LEONARD, E.J. "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL1)". *J. Immunol.* 139: 788-793. 1987.
- 19.- BOYLE, M.D.P; CHIODO, V.A; LAWMAN, M.J.P; GEE, A.P; YOUNG, M. "Urokinase: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo". *J immunol.* 139: 169-174. 1987.
- 20.- BOYLE, M.D.P; LAWMAN, M.J.P; GEE, A.P; YOUNG, M. "Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo". *J. Immunol.* 134: 564-568, 1985.

- 21.- DONABEDIAN, H. "Human mononuclear cells exposed to staphylococci rapidly produce an inhibitor of neutrophil chemotaxis". *J. Infect. Dis.* 152: 24-32. 1985.
- 22.- NUNOI, H; ENDO, F; CHIKAZAWA, S; MATSUDA, I. "Regulation of receptors and digestive activity toward synthesized formylchemotactic peptide in human polymorphonuclear leukocytes". *Blood.* 66: 106-114. 1985.
- 23.- NIEDEL, J.E; KAHANE, I. "Receptor-mediated internalization of fluorescent chemotactic peptide by human neutrophils". *Science.* 205: 1412-1414. 1979.
- 24.- SNYDERMAN, R; PIDE, M.C; KREDICH, N.M. "Role of transmethylation reactions in cellular motility and phagocytosis". *Mol. Immunol.* 17: 209. 1980.
- 25.- McPHAIL, L.C; SNYDERMAN, R. "Mechanisms of regulating the respiratory burst of leukocytes". En: "Contemporary topics in immunobiology". Ed. R. SNYDERMAN. N.Y. Plenum. 1984.
- 26.- WARD, P.A; BECKER, E.L. "Biology of leukotaxis". *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77: 125-148. 1977.
- 27.- BECKER, E.L; SHOWELL, H.J. "The effect of Ca^{++} and Mg^{++} on the chemotaxis responsiveness and spontaneous mobility of rabbit polymorphonuclear leukocytes". *Z. Immunol. Forsch.* 143: 466-476. 1972.
- 28.- GALLIN, J.I; ROSENTHAL, A.S.L. "The regulatory role of divalent cations in human granulocyte chemotaxis: Evidence for an association between calcium exchange and microtubule assembly". *J. Cell Biol.* 62: 594-609. 1974.
- 29.- KOO, C; LEFKOWITZ, R.J; SNYDERMAN, R. "Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes". *J. Clin. Invest.* 72: 748. 1983.
- 30.- GAMOW, E; BARNES, F.S. "Chemotactic responses of human polymorphonuclear leukocytes to cyclic GMP and other compounds". *Exp. Cell Res.* 87: 1-7. 1974.

- 31.- STOSSEL, T.P; HARTWIG, J.H. "Interactions between actin, myosin and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages". J. Biol. Chem. 250: 5706-5712. 1975.
- 32.- DAVIES, W.A; STOSSEL, T.P. "Peripheral hyaline blebs (podosomes) of macrophages". J. Cell Biol. 75: 941-55..1977.
- 33.- SPIELBERG, I; MANDELL, B; HOFFSTEIN, S. "A proposed model for chemotactic deactivation. Evidence for microtubule modulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis". J. Lab. Clin. Med. 94: 361-369. 1979.
- 34.- GOLDSTEIN, I; HOFFSTEIN, S; GALLIN, J; WEISSMANN, G. "Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes: microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement". Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70: 2916-2920. 1973.
- 35.- ZAKHIRECH, B; BLOCK, L.H; ROOT, R.K. "Neutrophil function and host resistance". Infection. 7: 88-98. 1979.
- 36.- CHEUNG, H.T; CANTARON, W.D; SUNDHARADAS, G. "Colchicine and citocalasine B (CB) effects on random movement, spreading and adhesion of mouse macrophages". Exp. Cell Res. 111: 95-103. 1978.
- 37.- STOSSEL, T.P. "Medical progress. Phagocytosis"(Three Parts)". N. Eng. J. Med. 290: 717-723; 774-780; 833-839. 1974.
- 38.- UNKELESS, L.C; FLEIT, H; MELLMAM, I.S. "Structural aspects and heterogeneity of immunoglobulin Fc receptors". Adv. Immunol. 31: 247. 1981.
- 39.- NITTA, T; SUZUKI, T. "Biochemical signals transmitted by Fc γ receptor. Triggering mechanisms of the increased synthesis of adenosine-3⁵- cyclic monophosphate mediated by Fc γ 2a and Fc γ 2b receptors of a murine macrophage-like cell line (P388 D 1). J. Immunol. 129: 2708-14, 1982.
- 40.- DIAMOND, B; YELTON, D.E. "A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG3". J. Exp. Med. 153: 514-19. 1981.

- 41.- RABELLINO, E.M; ROSS, G.D; POLLEY, M.J. "Membrane receptors of mouse leukocytes. I. Two types of complement receptors for different regions of C3". *J. Immunol.* 120: 871.1978.
- 42.- GOODMAN, M.G; CHENOWETH, D.E; WEIGLE, W.D. "Induction of interleukin I secretion and enhancement of humoral immunity by binding of human C5a to macrophage surface C5a receptors". *J. Exp. Med.* 156: 912. 1982.
- 43.- SNYDERMAN, R; PHILLIPS, J.K; MERGENHAGEN, S.E. "Biological activity of complement in vivo?. Role of C5a in accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates". *J. Exp. Med.* 134: 1131. 1971.
- 44.- IMBER, M; PIZZO, S; JOHNSON, W.J; ADAMS, D.O. "Selective diminution of the binding of mannose by murine macrophages in the letter stages of activation". *J. Biol. Chem.* 257: 5129-35. 1982.
- 45.- GRESHAN, H.D; CLEMENT, L.T; LEHMEYER, J.E; GRIFFIN, F.M; VOLANAKIS, J.E. "Stimulation of human neutrophil Fc receptor-mediated phagocytosis by a low molecular weight cytokine". *J. Immunol.* 137: 868-875. 1986.
- 46.- GRIFFIN, F.M; GRIFFIN, J.A; LEIDER, J.E; SILVERSTEIN, S.C. "Studies of the mechanism of phagocytosis. Requeriments for circumferential attachment of particlebound ligands to specific receptor on the macrophage plasma membrane". *J. Exp. Med.* 142: 1263-1282. 1975.
- 47.- GRIFFIN, J.M; GRIFFIN, J.A; SILVERSTEIN, S.C. "Studies on the mechanism of phagocytosis: II the interaction of macrophages with antiimmunoglobulin Ig-coated bone marrow-derived lymphocytes". *J. Exp. Med.* 144: 788-809. 1976.
- 48.- STOSSEL, T.P. "How do phagocytes eat?". *Ann. Int. Med.* 89: 398-402. 1978.
- 49.- JENSEN, M.S; BAINTON, D.F. "Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocyte". *J. Cell Biol.* 56: 379-388. 1973.

- 50.- BABIOR, B.M. "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes". *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668. 1978.
- 51.- CLINE, M.J. "Metabolism of the circulating leukocyte". *Physiol. Rev.* 45: 674-720. 1965.
- 52.- SBARRA, A.J; KARNOVSKY, M.L. "The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes". *J. Biol. Chem.* 234: 1355-1362. 1959.
- 53.- KLEBANOFF, S.J. "Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes". *Ann. Intern. Med.* 93: 480-489, 1980.
- 54.- BADWEY, J.A; KARNOVSKY M.L. "Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes". *Ann. Rev. Biochem.* 49: 695-726. 1980.
- 55.- SEGAL, A. W; JONES, O.T.G. "Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes". *Nature.* 276: 515-517, 1978.
- 56.- CRONSTEIN, B.N; KUBERSKY, S.M; WEISSMANN, G; HIRSCHHORN, R. "Engagement of adenosine receptors inhibits hydrogen peroxide (H_2O_2) release by activated human neutrophils". *Clin. Immunol. Immunopathol.* 42: 76-85. 1987.
- 57.- ALLEN, R.C; YEVICH, S.J; ORTH, R.W; STEELE, R.H. "The superoxide anion singlet molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 909-17, 1974.
- 58.- BABIOR, B.M; KIPNES, R.S; CURNUTTE, J.T. "Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent". *J. Clin. Invest.* 52: 741-744. 1973.
- 59.- BAINTON, D.F; FARQUHAR, M.G. "Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells". *J. Cell Biol.* 39: 299-317. 1968.

- 60.- AGNER, K. "Biological effect of hypochlorous acid formed by "MPO" peroxidation in the presence of chloride ions". En: "Structure and function of oxidation-reduction enzymes". 18: 329-335. A. AKSON, A. EHRENBERG. (ed). Pergamon Press. New York. 1972.
- 61.- KLEBANOFF, S.J. "Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system". J. Bacteriol. 95: 2131-2138. 1968.
- 62.- SELVARAJ, R.J; PAUL, B.B; STRAUSS, R.R; JACOBS, A.A; SBARRA, A.J. "Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPO-H₂O₂-Cl⁻ antimicrobial system". Infect. Immun. 9: 255-260. 1974.
- 63.- ZAKHIRECH, B; BLOCK, L.H; ROOT, R.K. "Neutrophil function and host resistance". Infection. 7: 88-98. 1979.
- 64.- ORAM, J.D; REITER, B. "Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents". Biochim. Biophys. Acta. 170: 351-365. 1968.
- 65.- SHAFER, W.N; MARTIN, L.E; SPITZNAGEL, J.K. "Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate". Infect. Immun. 45: 29-35. 1984.
- 66.- SELSTED, M.E; HARWIG, S.L. "Purification primary structure, and antimicrobial activities of a guinea-pig neutrophil defensin". Infect. Immun. 55: 2281-2286. 1987.
- 67.- NIKAIDO, H; NAKAE, T. "The membrane of Gram negative bacteria". Advanc. Microb, Physiol. 20: 163-250. 1979.
- 68.- BAVOIL, P; NIKAIDO, H; VON MEYENBURG, K. "Pleitropic transport mutant of E. coli lack porin, a major outer-membrane protein". Molec. gen. Genet. 158: 23-33. 1977.
- 69.- SHOCKMAN, G.D; BARETT, J.F. "Structure, function and assembly of cell walls of Gram positive bacteria". Ann. Rev. Microbiol. 37: 501-527. 1983.

- 70.- WAXMAN, D.J. "Penicillin-Binding-Proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics". *Ann. Rev. Biochem.* 52: 825-869. 1983.
- 71.- RIETSCHEL, E.T; SCHADE, U; JENSEN, M; WOLLENWEBER, H.W; LÜDERITZ, O; GREISMAN, S.G. "Bacterial endotoxins: Chemical structure, biological activity and role in septicemia". *Scand. J. Infect. Dis. (Supl)*. 31: 8-21. 1982.
- 72.- JANN, K; WESTPHAL, O. "Microbial polysaccharides". En: "The antigens," Vol.3 (Ed. M. SELA), pp. 1-125. Academic Press, N.Y.
- 73.- JANN, K; JANN, B. "The K antigens of Escherichia coli". *Prog. Allergy* 33: 53-79. 1982.
- 74.- BASCOM, F.A; HILL, H.R. "Gram-positive bacteria: An overview and summary of session". *Rev. Infect. Dis. (Supl 2)*. 10: S345-S350. 1988.
- 75.- ROGOLSKY, M. "Nonenteric toxin of Staphylococcus aureus". *Microbiol. Rev.* 43: 320. 1979.
- 76.- MANDELL, G.L; VEST, T.K. "Killing of intraleukocytic Staphylococcus aureus by rifampicin: "in vivo" and "in vitro" studies". *J. Infect. Dis.* 125: 486-490. 1972.
- 77.- EASMON, C.S.F; ADLAM, C. "Staphylococci and Staphylococcal infections". London. Academic Press, 1983.
- 78.- SHEPHERD, M.G; POULTER, R.T.M; SULLIVAN, P.A. "Candida albicans: Biology, genetic, and pathogenicity". *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 579-614. 1985.
- 79.- BRADFORD J. G; RETSINAS, E.M; LORENZ, J.S; HOSTETTER, M.K. "An iC3b receptor on Candida albicans: Structure, function, and correlates for pathogenicity". *J. Infect. Dis.* 157: 38-46. 1988.
- 80.- LEHRER, R.I; CLINE, M.J. "Interaction of Candida albicans with human leukocytes and serum". *J. Bacteriol.* 98: 996. 1969.

- 81.- DAVIS, B.D; DULBECCO, R; EISEN, H.N; GEINSBERG, H.S; WOOD, W.D. pp654. En:"Microbiology". HERPER and ROW. New York, and JOHN WEATHERHILL. Inc. Tokio. 1969.
- 82.- YUNIS, A.A. "Chloramphenicol-induced bone marrow suppression". *Semin. Hematol.* 10: 225-232. 1973.
- 83.- CHAUF, J.C. "Agranulocytosis associated with gentamicin". *JAMA* 232: 1154-1155. 1975.
- 84.- OPPENHEIM, M; MEYER, G. "Granulocytopenia and thrombocytopenia from streptomycin treatment". *Schweitz. Med. Wochenschr.* 79: 1187-1189. 1949.
- 85.- LIEDERMAN, E; MGABGAB, W.J. "Rifampin in B-hemolytic streptococcal pharyngitis and occurrence of leukopenia". *Clin. Med.* 77: 36-37. 1970.
- 86.- GOLDE, D.W; BRESCH, H; QUAN, S.G. "Trimethoprim and sulphamethoxazole inhibition of haematopoiesis en vitro". *Br. J. Haematol.* 40: 363-367. 1978.
- 87.- HOMAYOUNI, H; GROSS, P.A; SETIA, U; LYNCH, T.J. "Leukopenia due to penicillin and cefalosporins homologues". *Arch. Inter. Med.* 139: 827-828. 1979.
- 88.- REYES, M.P; PALUTKE, M; LERNER, A.M. "Granulocytopenia associated with carbenicillin". *Am. J. Med.* 54: 413-418. 1973.
- 89.- WESTERMAN, E.L; BRADSHAW, M.W; WILLIAMS, T.W. Jr. "Agranulocytosis during therapy with orally administered cloxacillin". *Am. J. Clin. Pathol.* 69: 559-560, 1978.
- 90.- WILSON, C; GREENHOOD, G; REMINGTON, J.S; VOSTI, K.L. "Neutropenia after consecutive treatment courses with nafcillin and piperacillin". *Lancet.* 1:1150. 1979.
- 91.- GHOSH, J.S. "Oxacillin induced granulocytopenia". *Acta Haematol. (Basel).* 61: 59. 1979.
- 92.- McELFRESH, M.D; HUANG, N.N. "Bone marrow depression resulting from the administration of methicillin". *N. Engl. J. Med.* 266: 246-247. 1962.

- 93.- PISCIOTTA, A.V. "Immune and toxic mechanisms in drug-induced agranulocytosis?". *Semin. Hematol.* 10: 279-310. 1973.
- 94.- YUNIS, A.A; GROSS, M.A. "Drug-induced inhibition of myeloid colony growth modifying effect of colony stimulating factor". *Clin. Res.* 23: 49-52. 1975.
- 95.- NEFTEL, K.A; Wälti, M; SPENGLER, H; et al. "Neutropenia after penicillins: toxic or immunemediated?". *Klin. Wochenschr.* 59: 877-888. 1981.
- 96.- HOLMES, B; QUIE, P.G; WINDHORST, D.B; POLLARA, B; GOOD, R.A. "Protection of phagocytized bacteria from the killing actions of antibiotics". *Nature.* 210: 1131-1132. 1966.
- 97.- MANDELL, L.A. "Interaction of intraleukocyte bacteria and antibiotics". *J. Clin. Invest.* 52: 1673-1679. 1973.
- 98.- JOHNSON, J.D; HAND, W.L; FRANCIS, J.B; KING-THOMPSON, N; CORWIN, R.W. "Antibiotic uptake by alveolar macrophages". *J. Lab. Clin. Med.* 95: 429-439. 1980.
- 99.- VANDAUX, P; WALDVOGEL, F.A. "Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes". *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 743-749. 1979.
- 100.- SHEPARD, C.C. "Use of HeLa cells infected with tubercle bacilli for the study of antituberculous drugs". *J. Bacteriol.* 73: 494-498. 1957.
- 101.- BROWN, K.N; PERCIVAL, A. "Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leukocytes". *Scand. J. Infect. Dis. (supl);* 14: 251-260. 1978.
- 102.- HAND, W.L; BOOZER, R.M; KING-THOMPSON, N.L. "Antibiotic uptake by alveolar macrophages of smokers". *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 42-45. 1985.
- 103.- PROKESCH, R.C; HAND, W.L. "Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes". *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 373-380. 1982.

- 104.- EASMON, C.S.F; CRANE, J.P. "Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils". J. Antimicrob. Chemother. 16: 67-73. 1985.
- 105.- TRAUB, W.H. "Bactericidal activity of bacterial DNA gyrase inhibitors against Serratia marcescens". Chomotherapy, 30: 379-386. 1984.
- 106.- KLEMPNER, M.S. "Antibiotic penetration into phagocytes. A determinant of therapeutic efficacy?". Drug. Ther. Hosp. 49: 49-53. 1982.
- 107.- HAND, W.L; KING-THOMSON, N.L. "Membrane transport of clindamycin in alveolar macrophages". Antimicrob. Agents Chemother. 21: 241-247. 1982.
- 108.- LORIAN, V. "Effect of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. En: Lorian, V. (Ed.). "Antibiotics laboratory medicine". WILLIAMS and WILKINS, Baltimore. 342-408. 1980.
- 109.- GNARPE, H; BLESHEIM, J; BLOMQUIST, C; LUNDBÄCK, A; SVENSSON, A.C. "The in vitro influence of ceftazidime on host defense mechanisms". J. Antimicrob. Chemother. 13: 369-375. 1984.
- 110.- BASSARIS, H.P; LIANOU, P.E; VOTTA, E.G; PAPAVALASSILIOU, JTh. "Effect of subinhibitory concentrations of cefotaxime on adhesion and polymorphonuclear leukocytes function with gram-negative bacteria". J. Antimicrob. Chemother. 14(supl.B): 91-96. 1984.
- 111.- ROOT, R.K; ISTURIZ, R; MOLAVI, A; METCALF, J.A; MALECH, H.L. "Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci. Studies with normal and cytochalasin B-treated cells". J. Clin. Invest. 67: 247-259. 1981.
- 112.- BASSARIS, H.P; LIANOU, P.E; PAPAVALASSILIOU, JTh. "Interaction of subminimal inhibitory concentrations of clindamicyn and Escherichia coli: Effect on adhesion and PMN leukocyte function". J. antimicrob. Chemother. 13: 361-367. 1984.

- 113.- PRUUL, H; McDONALD, P.J. "Enhancement of leukocyte activity against Escherichia coli after brief exposure to chloramphenicol". Antimicrob. Agents Chemother. 16: 695-700. 1979.
- 114.- McDONALD, P.J; WETHERALL, B.L; PRUUL, H. "Postantibiotic leukocyte enhanced: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotic to activity of leukocytes". Rev. Infect. Dis. 3: 38-44. 1981.
- 115.- PRUUL, H; LEWIS, G; McDONALD, P.J. "Enhanced susceptibility of gram-negative bacteria to phagocytic killing by human polymorphonuclear leukocytes after brief exposure to aztreonam". J. Antimicrob. Chemother. 22: 675-686. 1988.
- 116.- PRUUL, H; McDONALD, P.J. "Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils". J. Antimicrob. Chemother. 25: 91-101. 1990.
- 117.- GEMMEL, C.G; PETERSON, P.K; SCHMELING, D. et al. "Potentiation of opsonization and phagocytosis of Streptococcus pyogenes following growth in the presence of clindamicyn". J. Clin. Invest. 67: 1249-1256. 1981.
- 118.- KADURUGAMUWA, J; ANWAR, H; BROWN, M.R.W; ZAK, O. "Effect of subinhibitory concentrations of cephalosporins on surface properties and siderophore production in iron depleted Klebsiella pneumoniae". Antimicrob. Agents Chemother. 27: 220-223. 1985.
- 119.- VAN DEN BROEK, P.J. "Antimicrobial drugs, microorganism, and phagocytes". Rev. Infect. Dis. 2: 213-240. 1989.
- 120.- MUÑOZ, J; GEISTER, R. "Inhibition of phagocytosis of auromicyn". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75: 367-370. 1950.
- 121.- MELBY, K; MIDVEDT, T. "Effect of doxycycline on the phagocytosis of 32p, labelled E. coli by human PMN cells". Chemotherapy 27: 264-269. 1981.

- 122.- ESTERLY, N.B; FUREY, N.L; FLANAGAN, L.E. "The effect of antimicrobial agents on leukocytes chemotaxis". J. Invest. Dermatol. 70: 51-55. 1978.
- 123.- RAFF, M.J; BARNWELL, P.A; VAN ARSDALL, J.A; MELO, J.C. "The effect of minocycline and lysostaphin on the intracellular killing of S. aureus by polymorphonuclear leukocytes". En: EICKENBERG, H.U; HAHN, H; OPFERKUCH, W. (ed.) "The influence of antibiotic on the host-parasite relationship". Berlin, Heindenberg, N.Y.; Springer-verlag. 106-116. 1982.
- 124.- FORSGREN, A; SCHMELING, D; QUIE, P.G. "Effect of tetracycline on the phagocyte function of human leukocytes". J. Infect. Dis. 130: 412-415. 1974.
- 125.- LEHRER, R.I. "Effect of colchicine and chloranphenicol on the oxidative metabolism and phagocytic activity of human neutrophils". J. Infect. Dis. 127: 40-48. 1973.
- 126.- FORSCREN A; SCHMELING, D. "Effect of antibiotics on chemotaxis of human leukocytes". Antimicrob. Agents Chemother. 11: 580-584. 1977.
- 127.- LEHRER, R.I. "Inhibition by sulfonamides of the candidacidal activity of human neutrophil". J. Clin. Invest. 50: 2498-2505. 1971.
- 128.- GRAY, G.D; KNIGHT, K.A; TALLEY, C.A. "Rifampicin has paradoxical effect on leukotaxis". Fed. Proc. 39: 878. 1980.
- 129.- HÖGEL, P.H; VOSBECK, K; SEGER, R; HITZIG, W.H. "Uptake, intracellular activity, and influence of rifampicin on normal function of polymorphonuclear leukocytes". Antimicrob. Agents Chemother. 28: 667-674. 1985.
- 130.- FERRARI, F.A; PAGANI, A; MARCONI, M; STEFANONI, R; SICCARDI, A.G. "Inhibition of candidicidal activity of human neutrophil leukocytes by aminoglycoside antibiotics". Antimicrob. Agents Chemother. 17: 87-88. 1980.

- 131.- FIETTA, A; SACCHI, F; BERSANI, C; GRASSI, F; MANGIAROTTI, P; GRASSI, G. "Effect of B-lactam antibiotic on migration and bactericidal activity of human phagocytes". *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 930-931. 1983.
- 132.- LONG, M.H; KAPLAND, C; LEONARD, L.A; ROWLAND, H. "Antibiotics and human defense mechanism: the effect of ampicillin and cefotaxime on intra- and extracellular killing of Salmonella enteritidis". *J. Antimicrob. Chemother.* 14 (Supl. B): 81-89. 1984.
- 133.- WELCH, W.D; DAVIES, D; THRUPP, L.D. "Effect of antimicrobial agents on human PMN leukocytes function". *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 15-20. 1981.
- 134.- BJORKSTEN, B; RAY, C; QUIE, P.G. "Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemiluminiscence by amphotericin B". *Infect, Immun.* 14: 315-317. 1976.
- 135.- YASUI, K; MASUDA, M; MATSUOKA, T; YAMAZAKY, M; KOMIYAMA, A; AKABANE, T; MURATA, K. "Miconazole and amphotericin B alter polymorphonuclear leukocyte functions and membrane fluidity in similar fashions". *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1864-1868. 1988.
- 136.- JOHNSON, E.M; WARNOCK, D.W; RICHARDSON, M.D; DOUGLAS, C.J. "In vitro effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and candidacidal function of human neutrophils". *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 83-91. 1986.
- 137.- ABRUZZO, G.K; GILTINAN, D.M; CAPIZZI, T.P; FROMTLING, R.A. "Influence of six antifungal agents on the chemiluminiscense response of mouse spleen cells". *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 602-607. 1986.
- 138.- DAVIES, R.R; ZAINI, F. "Antifungal drugs affecting the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils". *Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.* 23: 119-123. 1985.

- 139.- MARMER, D.J; FIELDS, B.T; FRANCE, G.L; STEELE, R.W. "Ketocozazole, amphotericin B, and amphotericin B methylester: comparative, in vitro and in vivo toxicological effect on neutrophil function". *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 660-665. 1981.
- 140.- ABRUZZO, G.K; FROMTLING, R.A; TURNBULL, T.A; GILTINAN, D.M. "Effect of bifonazole, fluconazole, itraconazole, and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells". *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 61-68. 1987.
- 141.- ROILIDES, E; WALSH, T.J; RUBIN, M; VENZON, D; PIZZO, P. "Effect of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro". *Antimicrobial Agents Chemother.* 34: 196-201. 1990.
- 142.- MANDELL, L.A; MOHAMED, A. "Synergistic killing of gram-negative bacilli by cefotaxime, its desacetyl metabolite and human polymorphonuclear neutrophils". *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 817-828. 1991.
- 143.- LASSMAN, H.D; COOMBES, J.B. "Metabolism of cefotaxime: A review". *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2 (Sup.): 3S..1984.
- 144.- NEU, H.C. "Antibacterial activity of desacetylcefotaxime alone and in combination with cefotaxime". *Rev. Infect. Dis.* 4 (Supl.): S374. 1982.
- 145.- JONES, R.N; BARRY, A.L; THRONSBERRY, C. "Antimicrobial activity of desacetylcefotaxime alone and in combination with cefotaxime: Evidence of synergy". *Rev. Infect. Dis.* 4 (Sup. 7): S366. 1982.
- 146.- PHILLIPS, I. "Aminoglycosides". *Lancet* 2: 311-315. 1982.
- 147.- PANWALKER, A.P; MALOW, J.B; ZIMELIS, V.M; JACKSON, G.G. "Netilmicin: Clinical efficacy, tolerance and toxicity". *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 170-176. 1978.
- 148.- VANDEN BOSSCHE H. "Biochemical targets for antifungal azole-derivates. Hypotesis of de mode of action". *Curr. Top. Med. Mycol.* 1: 313-351. 1985.

- 149.- ROGERS, T.E; GALGIANI, J.N. "Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against Candida albicans in vitro and in vivo". Antimicrob. Agents Chemother. 30: 418-422..1986.
- 150.- HUMPHREY, M.J; JEVONS, S; TARBIT, M.H. "Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans". Antimicrob. Agents Chemother. 28: 648-653. 1985.
- 151.- De la Fuente, M. "Changes in the macrophage function with aging" Comp. Biochem. Physiol. 81 A: 935-938. 1985.
- 152.- KOSKY, I.R; POPLACK, D.G; BLAESE, R.N. "A nonspecific esterase stain for the identification of monocytes and macrophages". En: "In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity". Ed. B.R. BLOOM and J.R. DAVID. Academic Press. N.Y. 359..1976.
- 153.- WILKINSON, P.C. "Chemotaxis and inflamation". Ed. CHURCHILL LIVINGSTONE. Edimburg. London. pp. 174. 1974.
- 154.- JONES, R.W; BARRY, A.L; GRAVAN. T. TL; WASHINGTON, J.A. "Susceptibility tests: Microdilution and Macrodilution broth procedures". Eds. LENNETTE, E.H; BLOWS, A; HANSTER, W.J; SHADOMY, H.J. En: "Manual of clinical microbiology". 4th. ed; A.S.M. 972-977. 1985.
- 155.- EGGLETON, P; GARGAN, R; FISHER, D. "Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers". J. Immunol. Methods. 121: 105-113. 1989.
- 156.- METCALF, J.A; GALLIN, J.I; NAUSEF, W.M; ROOT, R.K. "Preparation of cells and material for functional assay" En: "Laboratory manual of neutrophil function". Raven Press. New York. 10. 1986.
- 157.- GARGAN, R; BRUMFITT, W; HAMILTON-MILLER, J.M.T. "Failure of water to lyse polymorphonuclear neutrophils completely. Role of pH and implications for assessment of bacterial killing". J. Immunol. Methods. 124: 289-291. 1989.

- 158.- GALGIANI, J.N; STEVENS, D.A. "Turbimetric studies of growth inhibitions of yeast with three drugs: inquiry into inoculum-dependent susceptibility testing, time of onset of drug effect, and implications for current and newer methods". *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 249-254. 1978.
- 159.- CURNETTE, J.T; BOXER, L.A. "Clinically significant phagocytic cell defect". En: "Current topics in infectious diseases clinical". (Eds.) J.S. REMINGTON and M.N. SWARTZ. MacGraw. New York. 1985.
- 160.- ALEXANDER J.W. "Antibiotic agents and immune mechanisms of defense". *Ann. N.Y. Acad. Med.* 51: 1039-1045. 1975.
- 161.- FINCH, R. "Immunomodulating effect of antimicrobial agents". *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 691-699. 1980.
- 162.- KHAN, A.J; EVANS, H.E; GLASS, L; KHAN, P; CHANG, C.T; NAIR, S.R. "Abnormal neutrophil chemotaxis and random migration induced by aminoglycoside antibiotics". *J. Lab. Clin. Med.* 93: 295-300. 1979.
- 163.- MAJESKI, J.A; McCLELLAN, M.A; ALEXANDER, J.W. "Effect of antibiotics on the in vitro neutrophil chemotactic response". *Am. Surg.* 42: 785-788. 1976.
- 164.- MARTIN, R.R; WARR, G; COUCH, R; YEAGER, H; KNIGHT, V. "Effect of tetracycline on leukotaxis". *J. Infect. Dis.* 129: 110-116. 1974.
- 165.- MAJESKY, J.A; MORRIS, M.J; ALEXANDER, J.W. "Action of cefoxitin and cefmandole on human neutrophil functions" *J. Antibiot.* 31: 1059-1062. 1978.
- 166.- RUBINSTEIN, A; PELET, B. "False negative N.T.B. tests due to transient malfunction of neutrophils". *Lancet* 1:382. 1973.
- 167.- RODRIGUEZ, A.B; PARIENTE, J; PRIETO, J; BARRIGA, C. "Effect of cefmetazol, cefoxitin and imipenem on polymorphonuclear leukocytes". *Gen. Pharmac.* 18: 613-615. 1987.

- 168.- SEKLECKI, M.M; QUINTILIANI, R; MADERAZO, E.G. "Aminoglycoside antibiotic moderately impair granulocyte function". *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 552-554. 1978.
- 169.- MCGREGOR, R.R; SPANCGCOLO, P.J; LENTNERK, A.L. "Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin measured with an assay system". *New Engl. J. Med.* 291: 642-646. 1974.
- 170.- BELSHEIM, J.A; GNARPE, G.H. "Antibiotics and granulocytes". *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C.* 89: 217-21. 1981.
- 171.- RODRIGUEZ, A.B; BARRIGA, C; PARIENTE, J.A; PRIETO, J. "Acción del cefmetazol sobre las funciones leucocitarias (estudio comparativo con N-formimidoiltienamicina). *Rev. Esp. Microbiol. Cli.* 1: 104-108. 1987.
- 172.- BURGALETA, C; MORENO, T. "Effect of B-lactams and aminoglycosides on human polymorphonuclear leukocytes". *J. antimicrob. Chemother.* 20: 529-535. 1987.
- 173.- BURGALETA, C; MARTINEZ-BELTRAN, J; BOUZA, E. "Comparative effect of moxalactam and gentamicin on human polymorphonuclear leukocytes functions". *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 718-720. 1982.
- 174.- GOODHART, G. "Effect of aminoglycosides on the chemotactic response of human polymorphonuclear leukocytes". *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 540-542. 1977.
- 175.- NELSON, R.D; QUIE, P.G; SIMMONS, R.L. "Chemotaxis and the agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes". *J. Immunol.* 115: 1650-6. 1975.
- 176.- QUIE, P.G. "Leukocyte chemotaxis". Raven Press. N.Y. p. 42. 1978.
- 177.- BIGNOLD, L.P. "Measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes in vitro". *J. Immunol. Methods.* 108: 1-18. 1988.

- 178.- WINKELSTEIN, M.C. "Opsonins: their function identify and clinical significance". J. Pediatr. 82: 747. 1973.
- 179.- EZEKOWITZ, R.A.B; SIM, R.B; HILL, M; GORDON, S. "Local opsonization by secreted macrophage complement components". J. Exp. Med. 159: 244-260. 1983.
- 180.- VALERIO, G; GRASSO, R; LELLA, A; PIRELLI, E; MUSCI, C; CARMINEO, N. "Effect of aztreonam and netilmicin upon macrophage function". Chemoterapia 5: 109-112. 1986.
- 181.- LINGAAS, E; MIDTVENT, T. "The influence of cefoperazone, cefotaxima, ceftazidime and aztreonam on phagocytosis by human neutrophils in vitro". J. Antimicrob. Chemother. 23: 701-710. 1989.
- 182.- LORIAN, V; DE FREITAS, C.C. "The minimum antibiotic concentrations (MACs) of aminoglycosides and beta-lactam antibiotic for some gram-negative bacilli and gram-positive cocci". J. Infect. Dis. 139: 599. 1979.
- 183.- PARKER, R.F; LUSE, S. "The action of penicillin on Staphylococcus: further observation on the effect of short exposure". J. Bacteriol. 56: 75-81. 1948.
- 184.- McDONALD, P.J; CRAIG, W.A; KUNIN, C.M. "Persistent effect of antibiotics on Staphylococcus aureus after exposure for limited periods of time". J. Infect. Dis. 135: 217-223. 1977.
- 185.- SANDE, M.A; MANDEL, G.L. "Antimicrobial agents: the aminoglycosides". En: GILMAN A.G; GOODMAN, L.S; RALL, T.W; et al, eds. GOODMAN and GILMAN's. "The pharmacological basis of therapeutic". 7th ed. New York. McMILLAN, 1150-69. 1985.
- 186.- WEISBLUM; DAVIES, J. "Antibiotic inhibitor of the bacterial ribosomes". Bacteriol. Rev. 32 (Sup.): 493-528. 1968.
- 187.- ALEXANDER, J.W; GOOD, R.A. "Effect of antibiotics on the bactericidal activity in human leukocytes". J. Lab. Clin. Med. 71: 971-983. 1968.

- 188.- VEALE, D.R; SMITH, H; WITT, K. "Penetration of penicillin into human phagocytes containing gonococci". *Lancet* 1: 306-8. 1975.
- 189.- ADINOLFI, L.E; UTILI, R; DILILLO, M; TRIPODI, M.F; ATTANASIO, V; RUGGIERO, G. "Intracellular activity of cefamandole and aztreonam against phagocytosed Escherichia coli and Staphylococcus aureus". *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 927-935. 1989.
- 190.- ADINOLFI, L.E; BONVENTRE, P.F. "Intraphagocytic activity of imipenem and piperacillin". *J. Antimicrob. Chemother.* 21: 508-10. 1988.
- 191.- VOSVECK, K; JAMES, P.R; ZIMMERMAN, W. "Antibiotic action on phagocytosed bacteria measured by a new method for determining viable bacteria". *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 735-741. 1984.
- 192.- LORIAN, V; ATKINSONS, B. "Bactericidal effect of polymorphonuclear neutrophils on antibiotic-induced filaments of gram-negative bacilli". *J. Infect. Dis.* 149: 719-27. 1984.
- 193.- VOGELMAN, B.S; CRAIG, W.A. "Kinetic of antimicrobial activity". *J. Pediatr.* 108 (5pt.2): 835-840. 1986.
- 194.- SHIMADA, K; KATO, H. "Schedule of intermittent cephalotin therapy". En: WILLIAMS, J.D; GEDDES, A.M. (Ed.) *Chemotherapy*. Vol. 5. "Penicillins and Cephalosporins". Plenum. N.Y. 277-282. 1976.
- 195.- MINGUEZ, F; CORRALES, I; GOMEZ-LUS, M.L; LURUEÑA, S; PRIETO, J. "Valoración del efecto postantibiótico de cinco grupos de antimicrobianos sobre Staphylococcus aureus y Escherichia coli". *Rev. Esp. Quimioterap.* 2: 161-165. 1989.
- 196.- GEORGOPAPADAKOU, N.H; KIU, F.Y. "Penicillin-binding proteins in bacteria". *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 148-157. 1980.
- 197.- WATANABE, Y; TAWARA, S; MINE, Y; KIKUCHI, H. "Sinergism of cephalosporins at subinhibitory concentrations and polymor-

- phonuclear leukocytes on phagocytic killing of Escherichia coli and its mode of actions". J. Antibiotics. 2: 294. 1986.
- 198.- RAPONI, G; KELLER, N, OVERBEEK, B.P; ROZENBERG-ARSKA, M; VAN KESSEL, K.P.M; VERHOEF, J. "Enhanced phagocytosis of encapsulated Escherichia coli strain after exposure to submics of antibiotics is correlated to changes of the bacterial cell surface". Antimicrob. Agents Chemother. 34: 332-336. 1990.
- 199.- GUTIERREZ, J; LIEBANA, J; MAROTO, M.C; PIEDROLA, G. "Efecto de las concentraciones subinhibitorias de ceftazidima, clindamicina y gentamicina sobre la fagocitosis de bacterias aerobias por los leucocitos neutrófilos". Rev. Esp. Quimioterap. 3: 47-53. 1990.
- 200.- WILSON, D.A; ROLISON, G.N. "The recovery period following exposure of bacteria to penicillins". Chemotherapy 25: 14-22. 1979.
- 201.- CUFFINI, A.M; CARLONE, N.A; XERRI, I; PIZZOGLIO, M.F. "Sinergy of ceftazidime and human macrophages on phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus and Pseudomona aeruginosa". J. Antimicrob. Chemother. 20: 261-271. 1987.
- 202.- FRIEDMAN, H; WARREN, G.H. "Enhanced susceptibility of penicillin-resistant Staphylococci to phagocytosis after in vitro incubation with low doses of nafcillin". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146: 707-711. 1974.
- 203.- VERHOEF, J; PETERSON, P.K; QUIE, P.J. "Human polymorphonuclear leukocytes receptors for staphylococcal opsonins". Immunology. 33: 231-239. 1977.
- 204.- KLEBANOFF, S.M. "Antimicrobial system in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes". Semin. Hematol. 12: 117-142. 1975.
- 205.- ROOT, R.K; METCALF, J.A. "Surface binding and enhanced killing of penicillin-treated S. aureus 502A by human neutrophils: mechanisms of the effect". Clin. Res. 27: 4801 (Abstr.). 1979.

- 206.- WILLIAMS, P. "Sub-mics of cefuroxime and ciprofloxacin influence interactions of complement and immunoglobulins with Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 758-762. 1987.
- 207.- KADURUGAWA, J.L; ANWAR, H; BROWN, M.R.W; ZAK, O. "Protein antigens growth in the presence of subinhibitory concentrations of cephalosporins". Antimicrob. Agents Chemother. 28: 195-199. 1985.
- 208.- SPIKA, J.S; VERBRUGH, H.A; VERHOEF, J. "Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of Staphylococcus aureus". Infect. Immun. 34: 455-460..1981.
- 209.- VERBRUGH, H.A; VAN DIJK, W.C; PETERS, R; VAN DER TOL, M.E; VERHOEF, J. "The role of Staphylococcus aureus cell wall peptidoglycan, teichoic acid and protein A in the processes of complement activation and opsonization". Immunology. 37: 615-621. 1979.
- 210.- VERHOEF, J; PETERSON, P; QUIE, P. "Kinetics of staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes: a quantitative assay using (³H)-thymidine labeled bacteria". J. Immunol. Method. 14: 303-311. 1977.
- 211.- VERINGA, E.M; VERHOEF, J. "Influence of subinhibitory concentrations of clindamycin on opsonophagocytosis of Staphylococcus aureus, a protein-A dependent process". Antimicrob. Agents Chemother. 30: 796-797. 1986.
- 212.- LIDA, K; KOIKE, M. "Cell wall alterations of gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics". Antimicrob. Agents Chemother. 5: 95-97. 1974.
- 213.- ANDREANA, A. PERNA, P; UTILI, R; DILILLO, M; RUGGIERO, G. "Increased phagocytosis and killing of Escherichia coli treated with subinhibitory concentrations of cefmandole and gentamicin in isolated rat livers". Antimicrob. Agents Chemother. 2: 182-186. 1984.

- 214.- COOK, A.M; BROWN, M.P.W. "Preliminary studies of heat-resistant bacteria, spores on paper carriers". J. Pharm. Pharmacol. 12 (Sup.): 16T-118T. 1960.
- 215.- KOCH, A.E; BURCHALL, J.J. "Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media". Appl. Microbiol. 22: 812-817. 1971.
- 216.- ANAISSIE, E; BODEY, G.P. "Nosocomial fungal infection: old problems and new challenges". Infect. Dis. Clin. North. America. 3(4): 867-882. 1989.
- 217.- BODEY, G.P. "The emergence of fungi as major hospital pathogens". J. Hosp. Infect. Dis. 8: 323-330. 1988.
- 218.- HORN, R; WONG, B; KIEHN, T.E; ARMSTRONG, D. "Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy". Rev. Infect. Dis. 7:646-654. 1985.
- 219.- WALSH, T.J; PIZZO, P. "Treatment of systemic fungal infection: recent progress and current problems". Eur. J. Clin. Microbiol. 7: 460-475. 1988.
- 220.- ANAISSIE, E; BODEY, G.P; RINALDI, M.G. "Emerging fungal pathogens". Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 323-330. 1989.
- 221.- LUTWICK, L; GALGIANI, J; JOHNSON, R; STEVENS, D. "Visceral fungal infections due to Petraallidium boydii (Allescheria boydii). In vitro drug sensitivity studies". Am. J. Med. 61: 632-640. 1976.
- 222.- REUBEN, A; ANAISSIE, E; NELSON, P.E; HASHEM, R; LEGRAND, C; HO, D.H; BODEY, G.P. "Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of Fuvarsarium species determined by using a broth microdilution method". Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1647-1649. 1989.
- 223.- ARNDT, C.A.S; WALSH, T.J; McCULLY, C.L; BAILS, R.M; PIZZO, P.A; POPLACK, D.G. "Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid: implications for treating fungal infections of central nervous system". J. Infect. Dis. 157: 178-180. 1988.

- 224.- FOUNDS, G; BRENNAN, D.R; WAJSZCZUK, C; CATANZARO, A; GARG, D.C; KNOPF, W; RINALDI, M; WEIDLER, D.J. "Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid in humans". J. Clin. Pharmacol. 28: 363-366. 1988.
- 225.- CALHOUN, D.L; ROBERTS, G.N; GALGIANI, J.N; BENNETT, J.E; FEINGOLD, D.S; JORGENSEN, J; KOBAYASHI, G.S; SHADOMY, S. "Results of a survey of antifungal susceptibility test in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B". B. J. Clin. Microbiol. 23: 298-301. 1986.
- 226.- GALGIANI, J.N. "Antifungal susceptibility test". Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1867-1870. 1987.
- 227.- McINTYRE, K.A; GALGIANI, J.N. "In vitro susceptibilities of yeasts to a new antifungal triazole, SCH 39304: Effect of test conditions and relation to in vivo efficacy". Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1095-1100. 1989.
- 228.- COOK, R.A; McINTYRE, K.A; GALGIANI, J.N. "Effect of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro- and microdilution broth susceptibility test result for yeast". Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1542-1545. 1990.
- 229.- CALHOUN, D.L; GALGIANI, J.N. "Analysis of pH and buffer effect on flucytosine activity in broth dilution susceptibility testing of Candida albicans in two synthetic media". Antimicrob. Agents Chemother. 26: 364-367. 1984.
- 230.- DOERN, G.V; TUBERT, T.A; CHAPIN, K; RINALDI, M.G. "Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeast". J. Clin. Microbiol. 24: 507-511. 1986.
- 231.- BANNATYNE, R.M; CHEUNG, R. "Susceptibility of Candida albicans to miconazole". Antimicrob. Agents Chemother. 13: 1040-1041. 1978.
- 232.- GALGIANI, J.N; YTURRALDE, C.A; DUGGER, K.O. "Susceptibility of Candida albicans to flucytosine when tested in different

- formulations yeast nitrogen base broth". *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 5: 273-276. 1986.
- 233.- MACKERROW, S.D; MERRY, J.M; HOEPRICH, P.D. "Effect of buffer on testing of Candida species susceptibility to flucytosine". *J. Clin. Microbiol.* 25: 885-888. 1987.
- 234.- UTZ, C; SHADOMY, S. "New medium for in vitro susceptibility studies with amphotericin B". *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 776-777. 1976.
- 235.- JOHNSON, B; WHITE, R.J; MERRY, J.M; WILLIAMSON, G.M. "Factor influencing the susceptibility of Candida albicans to the polyenoic antibiotics nystatin and amphotericin B". *J. Gen. Microbiol.* 104: 325-333. 1978.
- 236.- MINAGAWA, H; KITAWRA, K; NAKAMIZO, N. "Effect of pH on the activity of ketoconazole against Candida albicans". *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 105-107. 1983.
- 237.- BLOCK, E.R; JENNINGS, A.E; BENNETT, J.E. "Variables influencing susceptibility testing of Cryptococcus neoformans to 5-fluorocytosine". *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 392-395. 1973.
- 238.- GALGIANI, J.N; STEVENS, D.A. "Antimicrobial susceptibility testing of yeast: a turbidimetric technique independent of inoculum size". *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:721-726.1976.
- 239.- FROMTLING, R.A. "Overview of medically important antifungal azole derivatives". *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 187-217. 1988.
- 240.- BLANCO, M.T; PEREZ-GIRALDO, C; BLANCO, J; MORAN, F.J; HURTADO, C; GOMEZ-GARCIA, A.C. "In vitro studies of activities of some antifungal agents against Candida albicans ATCC 10231 by the turbidimetric method". *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 898-901. 1992.
- 241.- FROMTLING, R.A. "Imidazoles as medically important antifungal agents: an overview". *Drugs Today* 20: 325-349. 1984.

- 242.- VAN T WOUT, J.W; MATTIE, H; VAN FURTH, R. "Comparison of the efficacies of amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against a systemic Candida albicans in infection in normal and neutropenic mice". Antimicrob. Agents Chemother 33: 147-151. 1989.
- 243.- ANAISSIE, E; PAETNICK, V; BODEY, G.P. "Fluconazole susceptibility testing of Candida albicans : Microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading". Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1641-1646. 1991.
- 244.- KUJATH, P; LERCH, K. "New antimicrobial agents under clinical investigation. Secondary mycosis in surgery: treatment with fluconazole". Infection 17: 111-117. 1989.
- 245.- LEVINE, J; BERNARD, D.B; FARNHAM, H; SAUNDERS, C; SUGAR, A.M. "Fungal peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis : successful treatment with fluconazole, a new orally active antifungal agent". Am. J. Med. 86: 825-827. 1989.
- 246.- FISHER, M.A; LEE, P.G; TARRY, W.F. "Fluconazole (UK-49,858) treatment of candidiasis in normal and diabetic rats". Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1042-1045. 1989.
- 247.- PERFECT, J.R; SAVANI, D.V; DURACK, D.T. "Comparison of itraconazole and fluconazole in treatment of Cryptococcal meningitis and Candida pyelonephritis in rabbits". Antimicrob. Agents Chemother. 29: 579-583. 1986.
- 248.- TROKE, P.F; ANDREWS, R.J; BRAMMERS, K.W; MARRIOT, M.S; RICHARDSON; K. "Efficacy of UK-49,858 (fluconazole) against Candida albicans experimental infections in mice". Antimicrob. Agents Chemother. 28: 815-818. 1985.
- 249.- WALSH, T; LEE, J; AOKI, S; MECHINAUD, F; BACHER, J; LECCIONES, J; THOMAS, V; RUBIN, M; PIZZO, P.A. "Experimental basis for use of fluconazole for preventive or early treatment of disseminated candidiasis in granulocytopenic host". Rev. Infect. Dis. 12(Sup. 3): S307-317. 1990.

- 250.- MILLIKEN, S; POWLES, R; JONES, A. et al. "Pharmacokinetics of oral fluconazole in autologous bone marrow transplantation recipient given TBI and high-dose melphalan". *Transplant Proc.* 21: 3067. 1989.
- 251.- HOUANG, E.T; CHAPATTE, O; BYRNE, O; et al. "Fluconazole levels in plasma and vaginal secretions of patients after a 150-miligrams single oral dose and rate of eradication of infections in vaginal candidiasis". *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 909-10. 1990.
- 252.- SCHULTZ, J; KAMINKER, K. "Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization". *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 465-467. 1962.
- 253.- EBDEN, P; NEIL, P; FARROW, P.R. "Sputum levels of fluconazole in humans". *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 963-4. 1989.
- 254.- DELLENBACH, P. "Penetration of fluconazole into vaginal tissue and secretions". *R. Soc. Med. Int. Congr. Symp. Ser.* 160: 19-22. 1989.
- 255.- DEBRUYNE, D; RYCKELYNCK, J.P; MOULIN, M. et al. "Pharmacokinetics of fluconazole in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis". *Clin. Pharmacokinetic.* 18. 491-8. 1990.
- 256.- VANDEN BOSSCHE, H; BELLENS, D; COOLS, W; GORRENS, J; MARICHAL, H; VERHOEVEN, C; WILLEMSSENS, G; DE COSTER, R; BEERENS, D; HAELTERMAN, C; COENE, M.C; LAUWERS, W; LE JEUNE, L. "Cytochrome P-450: target for itraconazole". *Drug Dev. RES.* 8: 287-298. 1986.
- 257.- VANDEN BOSSCHE, H; WILLEMDENS, G; COOLS, W; MARICHAL, P; LAUWERS, W. "Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activation on N-substituted imidazoles and triazoles". *Biochem. Soc. Trans.* 11: 665-667. 1983.
- 258.- SHIGEMATSU, M.L; UNO, J; ARAI, T. "Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from Candida albicans". *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 919-924. 1982.

- 259.- UNO, J; SHIGEMATSU, M.L; ARAI, T. "Primary site of action of ketoconazole on Candida albicans". Antimicrob. Agents Chemother. 21: 912-918. 1982.
- 260.- DE NOLLIN, S; VAN BELLE, H; GOOSSENS, F; THONE, F; BORGERS, M. "Cytochemical and biochemical studies of yeast after in vitro exposure to miconazole". Antimicrob. Agents Chemother. 11: 500-513. 1977.
- 261.- SENIOR, D.S; SHAW, J.T.B. "In vitro effect of fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on Candida blastopore destruction by human polymorphonuclear leukocytes". Int. J. Immunopharmacol. 10: 169..1988.
- 262.- VAN ETEN, E.W.M; VAN DE RHEE, N.E; VAN KAMPEN, K.M; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. "Effect of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of Candida albicans". Antimicrob. Agents Chemother. 35: 2275-2281.1991.
- 263.- WILDFEUER, A; LAUFEN, H; HAFERKAMP, O. "Interaction of fluconazole and human phagocytic cells". Arzneimittel-Forsch Drug Res. 40: 1044-1047. 1990.
- 264.- CHILGREN, R.A; HONG, R; QUIE, P.G. "Human serum interactions with Candida albicans". J. Immunol. 101: 128-132. 1968.
- 265.- TASCHDJIAN, C.L; BURCHALL, J.J; KOZINN, P.J. "Rapid identification of Candida albicans by filamentation on serum and serum substituted". Amer. J. Dis. Child. 99: 212-215.1960.
- 266.- PAUL, B; SBARRA, A.J. "The role of the phagocyte in host-parasite interactions. XIII. The direct quantitative estimation of H₂O₂ in phagocytizing cells". Biochim. Biophys. Acta 156: 168-178. 1968.