

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE RESISTENTE A
CIPROFLOXACINO. ACTIVIDAD DE NUEVAS
QUINOLONAS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Luis Alou Cervera**

Bajo la dirección de los Doctores:
José Prieto Prieto
Fernando Fuentes Martínez

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1674-1

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

***Streptococcus pneumoniae* RESISTENTE A CIPROFLOXACINO.
ACTIVIDAD DE NUEVAS QUINOLONAS.**

TESIS DOCTORAL

Luis Alou Cervera
Madrid, Noviembre 2001

PROF. DR. JOSÉ PRIETO PRIETO, Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y DR. FERNANDO FUENTES MARTINEZ del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado: *Streptococcus pneumoniae* RESISTENTE A CIPROFLOXACINO. ACTIVIDAD DE NUEVAS QUINOLONAS, CONSTITUYE la Memoria presentada por Luis Alou Cervera para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Octubre de 2001.

Fdo. Dr. Fernando Fuentes Martínez

Fdo. Prof. Dr. José Prieto

Prieto

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. José Prieto Prieto, por la confianza que depositó en mi brindándome la oportunidad de realizar este trabajo, así como por sus consejos y orientaciones.

Al Dr. Fernando Fuentes Martínez, por su continuo estímulo y ayuda, por su dedicación en la preparación y revisión de este trabajo..

A la Profa. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles, por su ayuda y por sus siempre optimistas consejos.

A la Profa. Dra. Hermina de Lencastre, por darme la oportunidad de realizar parte de esta tesis en su departamento de Genética Molecular en Oeiras (Portugal).

Al Dr. Mario Ramírez, por sus consejos y orientaciones en el campo de la biología molecular durante mi estancia en Oeiras (Portugal).

Y muy especialmente a todos mis compañeros del laboratorio, Lourdes, Beatriz, Javi, David, Eva, Raquel, Almudena, Rebeca, Carmen, Pedro y María Teresa con los que he compartido tantas horas de trabajo y sobremesas, por su apoyo, comprensión y sobre todo su amistad.

Y a todos los que de algún modo han contribuido a que esta Tesis Doctoral viese la luz

A mis padres y mi hermano

Índice

I. Introducción.....	1
1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
1.1. Introducción histórica.....	3
1.2. Microbiología del neumococo.....	4
1.2.1. Morfología.....	4
1.2.2. Condiciones de crecimiento.....	5
1.2.3. Pruebas bioquímicas y de identificación.....	6
1.2.4. Análisis estructural.....	8
1.2.4.1. Cápsula.....	10
1.2.4.2. Pared celular.....	11
1.2.4.3. Membrana citoplasmática.....	11
1.2.5. Análisis antigénico.....	11
1.2.5.1. Antígenos capsulares.....	11
1.2.5.2. Antígenos no capsulares.....	12
1.2.6. Virulencia y defensas del huésped.....	14
1.2.7. Clasificación serológica.....	15
1.2.8. Infección neumocócica.....	17
1.2.9. Sensibilidad a antimicrobianos.....	18
1.2.10. Inmunidad y vacunas.....	20
2. Antimicrobianos.....	21
2.1. Quinolonas.....	21
2.1.1. Estructura química.....	22

2.1.2	Clasificación.....	24
2.1.2.1.	Atendiendo a la estructura química.....	24
2.1.2.2.	Atendiendo a la aparición en clínica.....	25
2.1.3.	Mecanismo de acción.....	26
2.1.4.	Mecanismos de resistencia.....	27
2.1.5.	Factores que influyen en la actividad de las quinolonas.....	28
2.2.	Trovafloxacino.....	29
2.2.1.	Estructura química.....	29
2.2.2.	Mecanismo de acción.....	30
2.2.3.	Espectro de acción.....	30
2.2.4.	Farmacocinética.....	31
-	2.2.4.1. Absorción.....	31
	2.2.4.2. Distribución.....	31
	2.2.4.3. Eliminación.....	32
2.2.5.	Interacciones medicamentosas.....	32
2.2.6.	Efectos secundarios.....	33
2.3.	Gemifloxacino.....	33
2.3.1.	Estructura química.....	33
2.3.2.	Mecanismo de acción.....	34
2.3.3.	Espectro de acción.....	34
2.3.4.	Farmacocinética.....	35
	2.3.4.1. Absorción.....	35
	2.3.4.2. Distribución.....	35
	2.3.4.3. Eliminación.....	36

2.3.5. Interacciones medicamentosas.....	36
2.3.6. Efectos secundarios.....	36
II. Objetivos.....	38
III. Material y Métodos.....	42
1. Material.....	43
1.1. Microorganismos.....	43
1.2. Medios de cultivo.....	43
1.3. Reactivos, compuestos químicos y biológicos.....	43
1.4. Antimicrobianos.....	44
1.5. Leucocitos polimorfonucleares (PMN).....	45
1.6. Instrumentos, aparatos y material fungible.....	45
2. Métodos.....	47
2.1. Estudio de sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de <i>S. pneumoniae</i>	47
2.1.1. Pruebas de sensibilidad.....	47
2.1.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	47
2.1.1.2. Concentración mínima bactericida (CMB).....	48
2.1.2. Aislados clínicos.....	48
2.2. Determinación de la actividad bactericida sérica de gemifloxacino y trovafloxacino	49
2.2.1. Voluntarios.....	49
2.2.2. Administración de la dosis y toma de muestras.....	50
2.2.3. Elección de las cepas.....	51

2.2.4. Concentraciones séricas de gemifloxacino y trovafloxacino por método microbiológico (bioensayo).....	51
2.2.5. Concentraciones plasmáticas de gemifloxacino y trovafloxacino por HPLC.....	53
2.2.6. Títulos bactericidas séricos	54
2.2.7. Tasa de muerte <i>ex vivo</i> de <i>S. pneumoniae</i>	56
2.2.7.1 Aislamiento de leucocitos PMN.....	56
2.2.7.2. Recuento y ajuste de leucocitos PMN.....	57
2.2.7.3. Estudio de la viabilidad de celular.....	58
2.2.7.4. Determinación de las curvas de letalidad.....	58
2.3. Efecto postantibiótico de gemifloxacino y trovafloxacino frente a <i>S. pneumoniae</i>	60
2.4. Influencia de suero en la sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de <i>S. pneumoniae</i>	62
2.4.1. Pruebas de sensibilidad.....	62
2.4.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	62
2.4.1.2. Concentración mínima bactericida (CMB).....	63
2.4.2. Aislados clínicos.....	63
2.5. Caracterización molecular de cepas de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a ciprofloxacino.....	65
2.5.1. Preparación de los discos de neumococos.....	67
2.5.2. Restricción de los discos.....	69
2.5.3. Electroforesis de campo pulsado.....	69
2.5.4. Tinción y fotografiado.....	70

2.6. Estudio de hibridación con una sonda del gen <i>pmrA</i>	70
2.6.1. Elaboración de la sonda.....	70
2.6.2. Transferencia del ADN por Southern blot.....	72
2.6.3. Preparación de la sonda marcada.....	72
2.6.4. Hibridación de la sonda.....	73
IV. Resultados.....	75
1. Sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a <i>S. pneumoniae</i>	76
2. Actividad bactericida sérica.....	78
2.1. Elección de cepas y sensibilidad.....	78
2.2. Concentraciones séricas de gemifloxacino y trovafloxacino por bioensayo y plasmáticas por HPLC	80
2.3. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos.....	84
2.4. Títulos bactericidas séricos.....	86
2.5. Tasa de muerte ex vivo de <i>S. pneumoniae</i> en sueros de voluntarios tratados con gemifloxacino y trovafloxacino.....	93
3. Efecto postantibiótico de gemifloxacino y trovafloxacino.....	101
4. Influencia del suero en la sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	105
5. Caracterización molecular de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a ciprofloxacino.....	107
6. Hhibridación con sondas del gen <i>pmrA</i>	117
V. Discusión.....	118
1. Sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a <i>S. pneumoniae</i>	119

2. Actividad bactericida sérica tras dosis de gemifloxacino y de trovafloxacino....	120
2.1. Elección de cepas y sensibilidad.....	120
2.2. Concentraciones séricas de gemifloxacino y trovafloxacino por bioensayo y plasmáticas por HPLC.	120
2.2. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos.....	123
2.3. Títulos bactericidas séricos.....	128
2.4. Tasa de muerte ex vivo de <i>S. pneumoniae</i> en sueros de voluntarios tratados con gemifloxacino y trovafloxacino.....	133
3. Efecto postantibiótico de gemifloxacino y trovafloxacino.....	137
4. Influencia del suero en la sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	139
5. Caracterización molecular de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a ciprofloxacino.....	141
6. Hibridación con sondas del gen <i>pmrA</i>	144
VI. Conclusiones.....	145
VII. Bibliografía.....	149

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
AUBC	Área bajo la curva de los títulos bactericidas
AUC_{0-24h}	Área bajo la curva
CIP	Ciprofloxacino
Cmax	Concentración máxima alcanzada en plasma
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
D.S.	Desviación estándar
EPA	Efecto postantibiótico
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
RII	Reducción del inóculo inicial
rpm	Revoluciones por minuto
TBS	Títulos bactericidas séricos
Tmax	Tiempo en alcanzar la Cmax
t_{1/2}	Vida media de eliminación
UFC	Unidades formadoras de colonias
v.o.	Vía oral

I. Introducción

Desde que se empezaron a utilizar los antibióticos con fines terapéuticos, se intentaron desarrollar unos métodos de investigación para relacionar el efecto *in vitro* que presentaba estas moléculas sobre los patógenos, con el efecto terapéutico real, esto es, la capacidad que presentaban dichos fármacos para eliminar los microorganismos causantes de una infección en un individuo. Ambos parámetros no tenían porque coincidir y aunque, generalmente, una mayor potencia demostrada *in vitro* por un determinado se correspondía con una mayor acción *in vivo* no siempre ocurría esto. Este es un problema que continua produciéndose actualmente con algunos antimicrobianos que se ensayan en el laboratorio, ya que en condiciones fisiológicas se ponen en juego un número mayor de factores y no únicamente bacterias y antibióticos. Cuando se administra un fármaco a un individuo hay que considerar, por ejemplo, los parámetros farmacocinéticos de cada antimicrobiano, como son su unión a proteínas, plasmáticas, difusión tisular, etc. Además, por supuesto, hay que tener en cuenta las relaciones que se establecen con el sistema inmune del individuo. Por ello, una buena valoración *in vitro* de la eficacia terapéutica de los antimicrobianos necesita de mejores criterios que exclusivamente los definidos como concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Los métodos actuales de estudio pretenden conseguir cada vez una mayor correlación entre lo que ocurre en el laboratorio y la situación que se produce en el organismo y ajustarse así cada vez más a las condiciones fisiológicas.

Aunque reproducir todas las condiciones que se establecen en el organismo sea una labor complicada y seguramente no pueda llevarse a cabo en condiciones experimentales, sería bueno aproximarse el máximo posible a estas condiciones antes de realizar ensayos *in vivo*. A este respecto se han descrito numerosas experiencias que

tratan de obtener una mejor medida de la eficacia terapéutica de un determinado fármaco de la que se consigue con criterios tales como la CMI. y la CMB.

Por otro lado, se hace necesario dado los resultados de los últimos años, un seguimiento de la evolución de las resistencias desarrolladas por los microorganismos frente a los agentes antimicrobianos más utilizados habitualmente, para poder valorar su continuidad como tratamiento terapéutico.

1. *Streptococcus pneumoniae*

1.1. Introducción histórica

Streptococcus pneumoniae ha sido uno de los microorganismos más estudiado desde que fue aislado en 1881 por Pasteur en la saliva humana. El estudio sistemático de sus propiedades como agente de enfermedad humana ha conducido a los más importantes descubrimientos de la biología médica. Después de su descubrimiento fue establecida su relación con la neumonía. Más tarde, en 1910 el reconocimiento de los distintos tipos serológicos condujo a la obtención de antisueros específicos y, con ello, al primer tratamiento eficaz de la neumonía neumocócica. Siguieron las observaciones de Avery, Heidelberger y Goebbel sobre la estructura química de los antígenos capsulares y su papel en la virulencia bacteriana. El descubrimiento de que los antígenos capsulares eran carbohidratos tuvo importantes efectos sobre la inmunología como ciencia, puesto que se pensaba que todas las sustancias inmunogénicas eran proteínas. En 1928, Griffith observó que las células de neumococo de un tipo serológico podían transformarse en células neumocócicas de otro tipo *in vivo*. Más tarde, Avery, McLeod y McCarthy descubrieron que el constituyente químico de las células neumocócicas

responsable de la transformación era su ADN. Otros importantes descubrimientos resultantes de la investigación en el neumococo fueron la eficacia terapéutica de la penicilina y el papel de la cápsula en la resistencia a la fagocitosis.

Durante los últimos años, este microorganismo ha recobrado una especial importancia debido a los importantes cambios en el comportamiento de los neumococos frente a los sucesivos antimicrobianos que se están utilizando en la clínica. Así, desde el punto de vista de la salud pública la importancia epidemiológica del neumococo, junto a la necesidad de vigilar los serotipos productores de enfermedad en cada país y la resistencia a los antimicrobianos en uso, hacen del neumococo un microorganismo de gran interés.

1.2. Microbiología del neumococo.

1.2.1. Morfología¶

Debido a su apariencia microscópica en forma de cocos ovales o lanceolados asociados típicamente en parejas, los neumococos fueron denominados *Diplococcus pneumoniae* por Weichselbaun, quien llevó a cabo un extenso estudio de la bacteriología de este microorganismo en 1886 (1). Sin embargo, Sternberg en 1897, expresó su disconformidad con ese nombre, debido a que "este micrococo en algunos medios de cultivo es capaz de formar cadenas de mayor o menor longitud, y es, de hecho, un estreptococo" (2). Experimentos posteriores basados en reacciones de transformación, demostraron la relación de los estreptococos y los neumococos (3, 4) (por lo que los neumococos fueron incluidos en el género *Streptococcus* (Rosembach 1884) perdurando el nombre específico de *Streptococcus pneumoniae* hasta nuestros

días (5).

La morfología microscópica, cocos ovals de 1,2 a 1,8 μm de diámetro mayor y 0,5-1,0 μm de diámetro menor unidos en parejas por su extremo distal, que presentan tinción de gram positiva en cultivos jóvenes, recubiertos por una cápsula polisacárida que puede teñirse diferencialmente por diversas técnicas (6) fue utilizada como método básico para la identificación de los neumococos en las primeras investigaciones.

Asimismo, la presencia de cápsula, y sobre todo su patogenicidad para conejos y ratones, fue también utilizada como método de caracterización. Actualmente, para diferenciar los neumococos de los estreptococos se realizan varias pruebas de laboratorio, entre las cuales destaca la lisis por bilis o sales biliares (7), la sensibilidad a la optoquina (8), la reacción de quellung (9) y la incorporación de colina (10).

1.2.2. Condiciones de crecimiento

Los neumococos presentan un crecimiento muy pobre en los medios de cultivo ordinarios necesitando medios enriquecidos con sangre, suero, glucosa, etc. Sus condiciones de crecimiento en cuanto a temperatura, pH y presencia de oxígeno son más restringidas que las de otros microorganismos, pudiéndosele considerar como uno de los organismos más lábiles y exigentes en la práctica diaria.

En relación con la temperatura este microorganismo crece entre 25 y 42°C, siendo su temperatura óptima de 35°C no observándose crecimiento ni a 10°C ni a 45°C. Asimismo crece en un pH comprendido entre 6.5-8.3, siendo el pH óptimo de crecimiento entre 7.4 y 7.8. No se observa crecimiento a pH de 9.6.

Es un microorganismo anaerobio facultativo que presenta una marcada

tendencia a acumular peróxido de hidrógeno cuando crece en condiciones aerobias; por ello, crece mejor en una atmósfera que contenga un 5% de CO₂.

Tras incubación en agar sangre o agar chocolate durante 18 horas a 35°C en presencia de 5% de CO₂, aparecen colonias circulares, pequeñas y elevadas, de 0.5-1 mm de diámetro, con una superficie lisa y brillante y con borde entero. Si se realiza una incubación prolongada, la zona central de la colonia se puede deprimir por autólisis. En agar sangre, las colonias se rodean de una zona de lisis eritrocitaria incompleta, denominada hemólisis alfa. La morfología de muchas colonias de neumococo en agar sangre es muy parecida a las colonias hemolíticas alfa de *S. viridans*.

Cuando se produce una excesiva síntesis de polisacárido capsular, frecuentemente en cepas del serotipo 3 y otros serotipos capsulados, se observan colonias mucosas de apariencia característica que pueden alcanzar un diámetro de 3 mm.

Aunque son cocos gram positivos durante la fase exponencial de crecimiento en medios artificiales, se vuelven gram negativos de modo progresivo al envejecer los cultivos. Si la incubación continúa, disminuye el número de células viables y el cultivo tiende a clarificarse. Estos cambios se deben a la acción de enzimas autolíticas, que primero transforman las células en gram negativas y posteriormente causan su lisis.

1.2.3. Pruebas bioquímicas y de identificación

Las pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pneumoniae* se recogen en la tabla 1.

Tabla 1 Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pneumoniae*.

CRECIMIENTO EN:		FERMENTACION DE:	
- Bilis esculina	Negativo	- Esculina	Negativo
- 6.5% CINa	Negativo	- Glicerol	Negativo
- 5% Sacarosa	Negativo	- Inulina	Positivo
- 45°C	Negativo	- Lactosa	Positivo
- 40% bilis	Negativo	- Manitol	Negativo
HIDROLISIS DE:		- Celobiosa	Positivo
- Arginina	Variable	- Rafinosa	Variable
FERMENTACION DE:		- Sacarosa	Positivo
- Piruvato	Negativo	- Sorbitol	Negativo
- Arabinosa	Negativo	- Trealosa	Variable

De entre las pruebas bioquímicas enumeradas, la de sensibilidad a la bilis y sales biliares ha sido y es todavía una de las más importantes en la identificación de los neumococos, pero probablemente, la característica más utilizada para la identificación del neumococo, sea su sensibilidad a la optoquina.

Sin embargo, la prueba que ha ganado una mayor aceptación en la identificación de los neumococos ha sido la prueba de "quellung" descrita por Neufeld en 1902 (9). Esta técnica se utiliza, tanto para el serotipado de cepas, usando sueros monovalentes

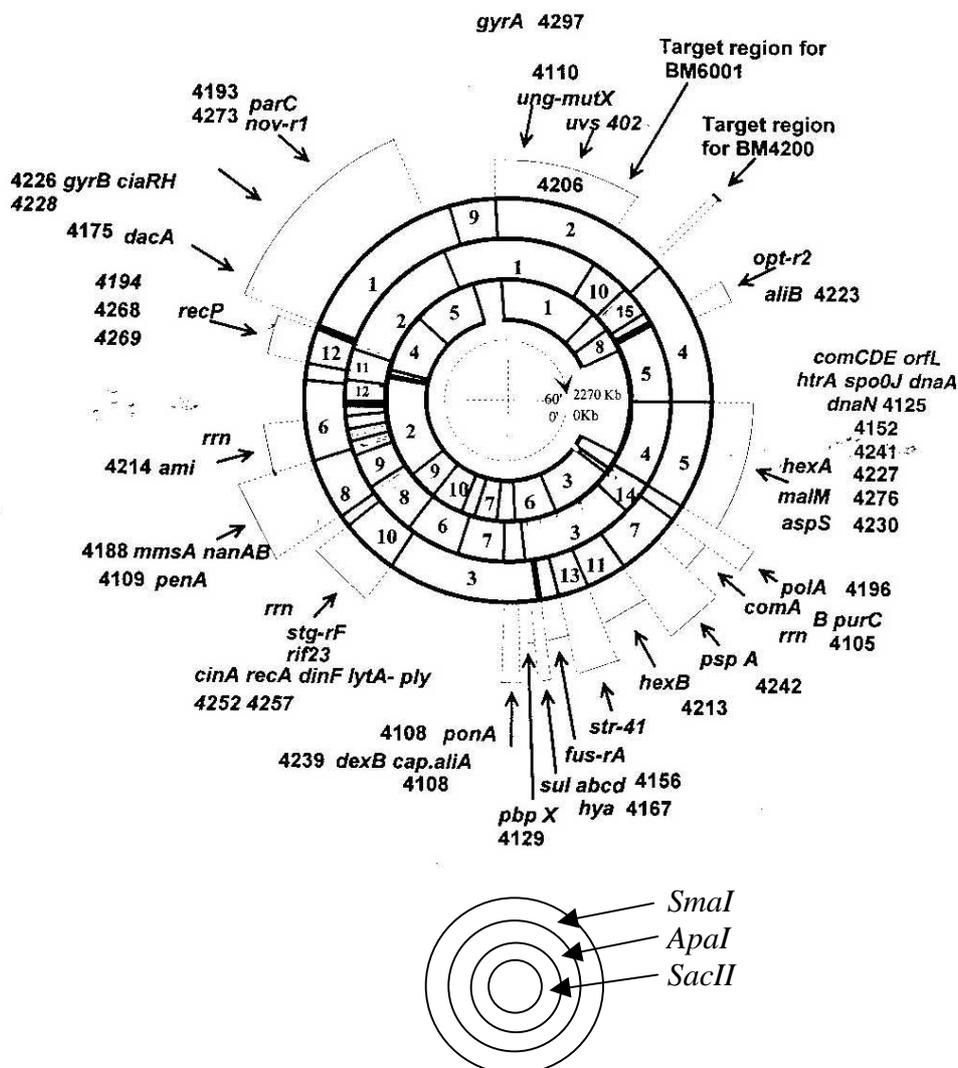
frente a los 90 tipos descritos (11), como en la identificación de aislados, para lo cual se utiliza un suero polivalente, denominado OMNI SERUM, que contiene una mezcla de antisueros frente a todos esos tipos.

Otra prueba que debemos mencionar, se basa en la característica de los neumococos de incorporar colina en contraste con los estreptococos (10). Esta técnica ha sido descrita para separar estas especies, cuando las cepas de neumococos son difíciles de identificar al no dar reacciones claras con las pruebas descritas anteriormente.

1.2.4. Análisis estructural

Los neumococos presentan la estructura clásica de una bacteria gram positiva, siendo su característica más destacada la de estar rodeada por una cápsula de naturaleza polisacárida. *S. pneumoniae* presenta un genoma con 2270 Kb, aunque la ausencia de un mapa genético ha sido una gran impedimento para la investigación en el campo de la genética molecular de este microorganismo. La característica de separar fragmentos largos de ADN por electroforesis de campo pulsado (pulse-field gel electrophoresis o PFGE) ha sido utilizada para realizar mapas bacterianos cromosómicos gracias a la utilización de enzimas de restricción como *SmaI*, *ApaI*, *SacII* (12). En la figura 1 se puede observar el mapa físico y genético de *S. pneumoniae* R6 utilizando diferentes enzimas de restricción.

Figura 1. Mapa físico y genético de *S. pneumoniae* R6 utilizando enzimas de restricción como *SmaI*, *ApaI* y *SacII* (12).



Por su localización externa, la cápsula representa el primer componente bacteriano frente al que reaccionan los organismos invadidos, desarrollando anticuerpos específicos. La cápsula es por ello, la envuelta más estudiada en sus aspectos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Sin embargo, existen evidencias que indican que otras zonas más profundas de la envuelta celular, podrían estar implicadas en procesos relacionados con la patogénesis del neumococo. Estas envueltas comprenden

la pared celular y la membrana citoplasmática, ambas conteniendo estructuras de interés para la fisiología del microorganismo.

1.2.4.1. Cápsula

Las cápsulas neumocócicas están compuestas por grandes polímeros polisacáridos que forman geles hidrófilos en las superficies de los organismos. Estos polisacáridos son antigénicos y forman la base para la separación de los neumococos en 90 serotipos diferentes. La composición química de la cápsula es variable, incluso dentro del mismo serotipo. Muchos serotipos poseen componentes ácidos (como el ácido D-glucorónico o grupos fosfato), ribitol, arabinitol o fosforilcolina. (13, 14). Por ejemplo, la cápsula del neumococo tipo 3 consiste en unidades repetidas de ácido celobiurónico disacárido formado por ácido D-glucurónico y D-glucosa conectados por enlaces glucosídicos beta-1-4. El polímero presenta grupos carboxilos libres, lo cual contribuye a la electronegatividad del organismo encapsulado.

Las cápsulas tienden a ser mayores durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la síntesis del polisacárido es máxima. En las últimas fases de crecimiento, cuando la síntesis ha disminuido, las cápsulas disminuyen debido a la difusión del polisacárido en el medio que los rodea.

Los neumococos, generalmente capsulados, pueden perder la propiedad de formar cápsula por mutación espontánea. Esta alteración se denomina comúnmente "mutación S-R" pues hace cambiar la superficie de las colonias de una textura lisa ("smooth") y brillante S, a otra relativamente rugosa ("rough") R. Cuando ocurre esta mutación, se produce una pérdida de virulencia frente al animal huésped, normalmente susceptible. Se ha demostrado que serotipos sin cápsula son menos virulentos y por lo

tanto son captados y destruidos por los fagocitos con más facilidad que los capsulados (virulentas) (15) y esto determina su incapacidad para producir una infección eficaz. Incluso hay estudios que afirman que las cepas capsuladas virulentas suelen ser sensibles a penicilina (16).

1.2.4.2. Pared celular

El neumococo posee una pared celular típica de las bacterias gram positivas, compuesta fundamentalmente por peptidoglicano (residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico) y ácidos teicoicos.

1.2.4.3. Membrana citoplasmática

En la membrana citoplasmática se encuentran localizadas proteínas a las que se atribuyen actividades enzimáticas importantes, tales como autolisinas, endonucleasas, proteínas activadoras e inhibidoras y proteínas fijadoras de penicilina (PBPs o penicilin binding proteins) (17, 18, 19). Otro componente superficial importante que se fracciona con la membrana citoplasmática es el antígeno de Forssman (20), cuyo papel y composición se detallará más adelante.

1.2.5. Análisis antigénico

1.2.5.1. Antígenos capsulares

La constitución química de algunos antígenos capsulares de los nuevos tipos de neumococos, todavía no se ha determinado. Sin embargo, se puede asumir con seguridad que cada tipo de neumococo está caracterizado por un polisacárido capsular específico que determina su comportamiento antigénico. Estos tipos se pueden

identificar por aglutinación, reacción de quellung o por pruebas de precipitación realizadas con un extracto de las cápsulas neumocócicas.

Algunos de estos polisacáridos de neumococos pueden existir en formas inmunológicamente diferentes, o pueden ser alterados durante el proceso de extracción química y purificación.

1.2.5.2. Antígenos no capsulares

Polisacárido C: El polisacárido capsular no es, de hecho, el único constituyente antigénico del neumococo. En 1930, se aisló otro componente que presentaba todas las reacciones usuales de un polisacárido, no se inactivaba por digestión péptica o trípica, y producía en hidrólisis, alrededor de un 30% de azúcares reductores, y contenía un 6.1% de nitrógeno. Sin embargo, difería del polisacárido capsular en que contenía ácido fosfórico. No era tipo-específico, pero parecía caracterizar al neumococo como especie. Se le designó como "polisacárido C" o somático, y se parece en algunos aspectos a los antígenos grupo específicos de los estreptococos hemolíticos. Este carbohidrato es el mayor componente estructural de la pared celular de todos los neumococos. El polisacárido C es un polímero de ácido teicoico que contiene fosfocolina como determinante antigénico mayoritario. La fosfocolina es la responsable de la aglutinación de los neumococos por ciertas proteínas del mieloma (21) y de la interacción del polisacárido C con una beta-globulina del suero en presencia de calcio; esta beta-globulina llamada "proteína C reactiva" (22) no es un anticuerpo sino una proteína que en la sangre normal se encuentra presente en baja concentración, pero su concentración es elevada en la sangre de pacientes con enfermedades inflamatorias agudas. La unión de la proteína C reactiva al polisacárido C, puede activar el complemento y mediar la

fagocitosis. El polisacárido C, además de fosfocolina, contiene N-acetil-galactosamina, glucosa, fosfato, ribitol y diaminotrideoxihexosa.

Antígeno de Forssman: Este antígeno es un ácido lipoteicoico que se parece al antígeno polisacárido C ya que contiene colina, pero se diferencia en que el antígeno F se encuentra localizado en el exterior de la superficie de la membrana celular, donde está fuertemente unido a ácidos grasos

El antígeno F se parece, en gran número de propiedades físico-químicas y fisiológicas, a los ácidos teicoicos de membrana de bacterias gram positivas, y esto sugiere que el antígeno F, con una estructura química compleja, pueda considerarse un equivalente funcional de los más convencionales ácidos teicoicos de membrana. El antígeno F es un potente y altamente específico inhibidor de la autolisina homóloga, la cual es una enzima ácido-N-acetil-murámico-L-Iisina arnidasa (23). El hecho de que el antígeno F sea un potente inhibidor de la autolisina sugiere un papel fisiológico específico de los ácidos lipoproteicos en la regulación *in vivo* de la actividad hidrolasa de la mureína en el organismo. Además, el antígeno F realiza también una importante función en los procesos de adherencia bacteriana.

Proteína M: Constituidas por una serie de proteínas tipo-específicas, solubles en ácido-alcohol, las proteínas M son importantes en la determinación de la heterogeneidad antigénica de las cepas no capsuladas.

1.2.6. Virulencia y defensas del huésped

Es bien conocida la colonización por *S. pneumoniae* de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior (24) y ello tiene relación indudablemente con la existencia de una gran proporción de portadores entre los individuos sanos. Es indudable que se produce una penetración en los tejidos desde los lugares de colonización en las membranas mucosas, pero su mecanismo de acción aún es oscuro. A pesar de esto, está comenzando a conocerse la influencia de los factores de virulencia de este microorganismo y de las defensas utilizadas por el huésped. Pueden contribuir a la virulencia algunos agentes tóxicos producidos por *S. pneumoniae*, así por ejemplo, los neumococos producen una toxina hemolítica, denominada neumolisina, la cual está inmunológicamente relacionada con las hemolisinas O oxigenolábiles de los estreptococos hemolíticos y algunas especies del género *Clostridium* (*Clostridium tetani* y *Clostridium welchii*). La neumolisina es citolítica a altas concentraciones y citotóxica a bajas concentraciones. Esta toxina inhibe el movimiento ciliar, la actividad bactericida de los polimorfonucleares e inhibe la síntesis de anticuerpos (25).

No obstante, la virulencia de los neumococos no depende directamente de los factores tóxicos, sino de la cápsula de polisacáridos. Así la estructura química de los polisacáridos capsulares determinan el que un serotipo sobreviva en el torrente sanguíneo y pueda causar infección invasiva. Esto es debido a las diferencias entre los distintos serotipos en términos de activación de la ruta alternativa del complemento (26), degradación de los componentes del complemento en la cápsula (27), resistencia a la fagocitosis (28) y la capacidad de generar anticuerpos (14).

La resistencia del huésped a la infección depende de la rapidez con que las células fagocíticas eliminan al microorganismo invasor ya que los *S. pneumoniae* son destruidos rápidamente después de la ingestión. Por tanto, la resistencia del huésped

depende de la activación del sistema de complemento (29), ya que este promueve a su vez la fagocitosis.

En el huésped susceptible, los ácidos teicoicos de la pared celular del neumococo activan la vía alternativa del complemento; es probable que los polisacáridos neumocócicos no sean capaces de activar esta vía. En los huéspedes inmunes, los neumococos activan la vía clásica al ser sensibilizados por anticuerpos dirigidos contra su sustancia capsular. Dado que la activación de la vía clásica requiere anticuerpos específicos capsulares, esta se produce relativamente tarde durante la enfermedad, después de haber comenzado la síntesis del anticuerpo o tras una infección posterior con el mismo tipo capsular. Independientemente de la vía activada, el componente C3b del complemento es el factor activo que promueve la fagocitosis, pero su eficacia a este respecto depende de ciertas variables, siendo la más importante la localización del C3b sobre la superficie bacteriana. Cuando el C3b se activa por la vía alternativa, se fija al parecer a la superficie subcapsular de la bacteria. En este lugar, la cápsula actúa como una barrera física para el reconocimiento del C3b por los fagocitos, y el efecto de la opsonización por dicho factor disminuye o se pierde. Por otra parte, la activación de la vía clásica da como resultado la producción de C3b, que se asocia junto con el anticuerpo a la superficie capsular, donde es reconocido por los fagocitos al tiempo que se provoca la ingestión (30). Por tanto, la activación de la vía clásica por anticuerpos capsulares específicos es mucho más efectiva que la inducción de la opsonización y, sirve como base teórica para la inmunización. La activación de la vía alternativa es menos eficaz en este sentido, pero puede promover la fagocitosis si se forman grandes cantidades de C3b. Existen diferencias con respecto a las distintas cepas de neumococos, de modo que las que inducen la producción de cantidades mayores de

C3b son opsonizadas con una eficacia mayor y, por tanto, son menos virulentas.

Hay que destacar los posibles efectos de las respuestas del huésped sobre la patogénesis de las infecciones neumocócicas. Se cree, aunque no se ha demostrado, que la activación del complemento y la acción de las células fagocíticas podría dar lugar a una lesión inflamatoria del tejido; la activación de los componentes C3a y C5a, por ejemplo, estimula la liberación de histamina y serotonina. El C5a es también quimiotáctico y estimula en los neutrófilos la liberación de enzimas y de metabolitos oxigenados tóxicos; estas sustancias se liberan también durante la ingestión de las células bacterianas. Por tanto, existe la posibilidad de que se produzcan lesiones tisulares durante los procesos que acompañan a las respuestas defensivas del huésped frente a las infecciones neumocócicas (31).

1.2.7. Clasificación serológica

El principal método de clasificación de los neumococos se basa en la detección de antígenos polisacáridos de la cápsula mediante pruebas serológicas, de las cuales la más utilizada es la denominada "quellung" o prueba de hinchazón de la cápsula, aunque también se pueden utilizar otras técnicas serológicas tales como aglutinación, coaglutinación (32) y el dot blot (33). Existen diferentes clasificaciones serológicas para el neumococo, la americana asigna los números cronológicamente por su aislamiento, mientras que la clasificación danesa la más utilizada hoy en día está basada en características antigénicas (34).

1.2.8. Infección neumocócica

Los neumococos se encuentran formando parte de la flora normal del tracto respiratorio humano en el 5 al 60% de la población según las diferentes estaciones del año. Se ha sugerido que la unión de los neumococos al epitelio faríngeo está mediado por un receptor de la fibronectina (35). Los mecanismos por los cuales los neumococos pasan de la nasofaringe hacia el pulmón, por lo tanto produciendo neumonía o migran directamente a la sangre produciendo bacteriemia todavía no está muy bien comprendido (36).

La mayoría de las infecciones no se producen tras un estado largo de portador si no por la adquisición de serotipos recientes (36). Esto sugiere que el estado inmune en el que se encuentre el huésped en el momento de la colonización tanto como la virulencia de la cepa determinan si el neumococo permanecerá confinado en la nasofaringe o llegará a ser invasivo. Fallos en las defensas específicas (IgA) o no específicas (secreción de las mucosas, transporte ciliar, etc) del tracto respiratorio pueden facilitar el paso de los neumococos a los pulmones (37). Los efectos de la neumolisina sobre los cilios y los efectos de la proteasa IgA1 secretada por *S. pneumoniae* podría también afectar a las defensas citadas anteriormente. Además el daño en el epitelio causado por infecciones virales previas en las vías respiratorias también favorece el paso de los neumococos al torrente sanguíneo y de ahí a los pulmones o a las meninges, aunque también se pueden pasar a las meninges directamente desde la nasofaringe. La presencia de lisozima en el sitio de infección contribuye a la lisis de los neumococos a través de la activación de la autolisina. Esta lisis pone en marcha el proceso inflamatorio, directamente por la atracción de y activación de fagocitos e indirectamente a través de la activación del complemento.

La susceptibilidad a la infección suele estar provocada por una serie de factores

de predisposición entre los que se incluyen la edad avanzada, existencia de inmunodeficiencias nutrición inadecuada, exposiciones graves o repentinas al frío, fatiga, consumo de alcohol, diabetes, procesos infecciosos víricos como gripe, adenovirus y fiebre Q, procesos broncopulmonares crónicos tributarios de respiración asistida, y ciertas enfermedades como síndrome nefrótico, Hodgking y mieloma múltiple.

1.2.9. Sensibilidad a antimicrobianos

El tratamiento de la neumonía neumocócica se ha basado durante casi 40 años, en la utilización de la penicilina, debido a la sensibilidad inicial de los neumococos a este antibiótico. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a penicilina y a otros antimicrobianos ha alterado notablemente la situación en los últimos años, por lo que hoy día resulta necesario un control estricto del estado actual de las resistencias.

Ya a principios de los años 40, se habían aislado en el laboratorio cepas de neumococos resistentes a penicilina (38, 39) pero hasta 1967 en Australia no se describió el primer aislado clínico resistente, el cual resultó ser de resistencia intermedia a penicilina (0.6 µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml) (40). En 1971 en Nueva Guinea, fueron descritos más casos de resistencia (41), en 1974, un 12% de 518 aislados de Nueva Guinea eran resistentes a penicilina (42), y en 1980 un tercera parte de los aislados eran resistentes (43)

El primer caso de infección producida por un neumococo resistente en EEUU, se produjo en 1974 (44). En 1977 ocurrió en Sudáfrica (45) un importante brote con varias muertes en niños hospitalizados; los neumococos aislados eran altamente resistentes a penicilina (CMI = 4-8µg/ml), presentando además resistencias múltiples. Estas cepas se

extendieron posteriormente a otros hospitales sudafricanos. A partir de este brote se intensificó la investigación sobre resistencias, que se han ido describiendo en numerosos países tanto desarrollados como en vías de desarrollo (46).

En Europa, España es el país en el que el índice de resistencias del neumococo es más elevado, seguido de cerca por Hungría y Polonia (47, 48). Además de a la penicilina, los neumococos han desarrollado resistencias a otros antimicrobianos como la tetraciclina, sulfamidas, eritromicina, cloranfenicol, siendo frecuente la presencia de resistencias múltiples (49, 50). En la actualidad se ha empezado a describir la aparición de *S. pneumoniae* resistente a ciprofloxacino y otras quinolonas (51).

Por otro lado en los estudios de sensibilidad se analiza siempre un antimicrobiano de cada grupo y normalmente en los estudios de aislados de la comunidad se suelen ensayar fármacos como penicilina, eritromicina y ciprofloxacino; estos fármacos se utilizan, respectivamente como representantes de los betalactámicos, los macrólidos y las quinolonas. Por eso la discusión que se plantea en estos momentos se fundamenta en la necesidad de distinguir, en lo que respecta al patrón de resistencias, si existen diferencias importantes entre estos fármacos que actúan como marcadores o representantes y los demás antimicrobianos de cada grupo.

S. pneumoniae es uno de los principales microorganismos en los que se precisa esta revisión del efecto de cada uno de los antimicrobianos debido a se ha mostrado como uno de los agentes infecciosos que más resistencias están presentando en los últimos años y que se asocian con unos patrones de sensibilidad más inestables.

Se ha podido observar que existen falsas creencias en relación con la terapia antimicrobiana, así es típico considerar que la resistencia a penicilina en el neumococo va a inutilizar el posible uso de betalactámicos para hacer frente a este microorganismo.

Por otro lado, ocurre lo mismo con las quinolonas por lo que la progresiva pérdida de sensibilidad lleva a muchos médicos a rechazar la administración de otros antimicrobianos de esta familia. Como hemos mencionado anteriormente las tasas de resistencia a las quinolonas siguen siendo relativamente bajas, pero el uso masivo que se ha hecho de estos fármacos en los últimos años para el tratamiento de las infecciones respiratorias nos puede deparar desagradables sorpresas para el futuro. Aunque algunos autores utilizan a ciprofloxacino como marcador de grupo, otros autores opinan que ciprofloxacino no resulta un fármaco especialmente representativo.

1.2.10. Inmunidad y vacunas

La inmunidad frente a las infecciones por neumococos reside en anticuerpos frente al antígeno polisacárido capsular. La inmunización activa del hombre frente a infecciones neumocócicas ha sido una materia de gran interés desde los estudios de inoculaciones en masa realizados en 1918-1919. La gran cantidad de tipos capsulares y la quimioterapia impidieron, sin embargo, el desarrollo de vacunas con fines profilácticos.

La continua incidencia de las enfermedades neumocócicas tanto en niños como adultos, junto a la aparición de cepas resistentes, condujo al desarrollo, a finales de la década de 1970, de una nueva vacuna polivalente contra los neumococos. En 1977 fue patentada en los EEUU una nueva vacuna neumocócica, basada en los serotipos más frecuentes encontrados en las infecciones de los adultos, que contiene polisacáridos capsulares purificados a partir de los 14 tipos de neumococos predominantes. Con objeto de aumentar la cobertura de esta vacuna, a mediados de los años 80 se incrementó el número de antígenos que la constituían de 14 a 23. La efectividad de esta vacuna en poblaciones inmunizadas protege en un 70-80% de las infecciones

provocadas por los neumococos. Aunque con algunas reservas, la creencia general es que la vacuna ofrece una protección contra los graves efectos de las enfermedades neumocócicas en ciertos grupos de riesgo (guarderías, enfermedades crónicas, alcoholismo, leucemia, etc.). Sin embargo esta vacuna presenta algunas limitaciones ya que no induce una respuesta en niños menores de 2 años. Actualmente se está ensayando una vacuna conjugada que presenta los 7 serotipos más importantes epidemiológicamente hablando. Datos preliminares sugieren que esta vacuna es muy efectiva en niños menores de 2 años y presenta un 95% de efectividad en la prevención de enfermedades invasivas (52). El impacto de la vacunación en masa sobre los serotipos no incluidos en esta vacuna no están claros, ya que se podría producir un aumento de la resistencia en aquellos serotipos no cubiertos por la vacuna.

2. Antimicrobianos

2.1. Quinolonas

El desarrollo de este grupo de sustancias fue lento, y se inició en 1962 con el descubrimiento al azar del ácido nalidíxico durante el proceso de purificación de la cloroquina (53, 54). Su espectro de actividad *in vitro* era reducido, limitado a bacterias aerobias gram negativas, con un perfil farmacocinético desfavorable, limitándose su uso terapéutico en infecciones del tracto urinario. Más tarde se fueron desarrollando más derivados, que no diferían mucho del ácido nalidíxico en cuanto al espectro de acción o la farmacocinética: ácido oxolínico, cinoxacino, flumequina y otros, los cuales también se vieron limitados al tratamiento de las infecciones de las vías urinarias. Diez años más tarde, aparecieron otras moléculas, como el ácido pipemídico y la rosoxacina,

con un radical piperazinil en posición siete que confiere a la molécula actividad sobre *Pseudomonas* (55). Poco tiempo después se produjo un rápido avance en el desarrollo de otras quinolonas, las nuevas fluorquinolonas. Este nuevo grupo incorporó un átomo de flúor en la posición 6, con lo que se mejoró la farmacocinética y se amplió el espectro. En 1978, con la publicación de la síntesis del norfloxacin (56), se inició la etapa más importante de estos compuestos. Posteriormente los nuevos descubrimientos no han cesado, siendo muy numerosos estos fármacos, algunos comercializados, otros abandonados y otros en fase avanzada de desarrollo o simplemente patentados. Estas moléculas, en comparación con las más antiguas, son más activas y más bactericidas, por lo que se necesitan dosis más bajas para el tratamiento.

2.1.1. Estructura química

Las quinolonas son sustancias bicíclicas que, como se puede ver en la figura 3, tienen en común una estructura central constituida por un anillo 4-oxo- 1,4-dihidroquinoleína, utilizando el término de 4-quinolona para designar a la quinolona sustituida (57).

- | |
|---|
| <p>1.- NAFTIRIDONAS
$X = X_I = X_{II} = C$</p> <p>2.- CINOLONAS
$X = N; X_I = X_{II} = C$</p> <p>3.- PIRIMIDIN-PIRIDONAS
$X = C; X_I = X_{II} = N$</p> <p>4.- QUINOLONAS
$X = X_I = X_{II} = C$</p> |
|---|

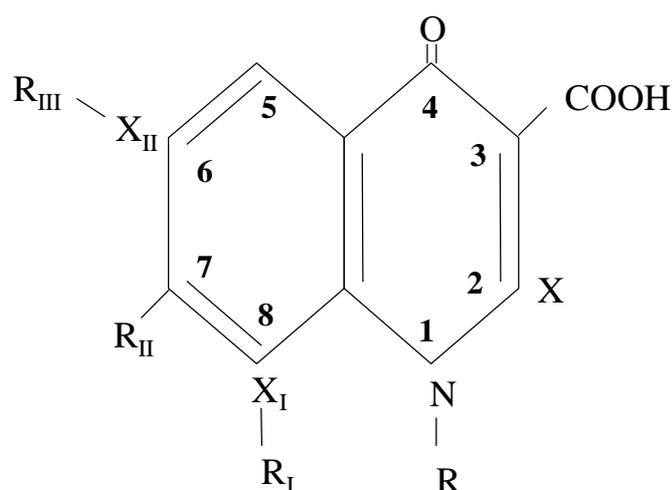


Figura 2. Estructura química de las quinolonas

A esta molécula puede incorporarse una serie de radicales y sustituciones que influyen de forma importante en sus características y propiedades (58, 59, 60). El radical carboxilo de la posición 3 y el grupo cetónico de la posición 4 son totalmente imprescindibles para ejercer su actividad antibacteriana, ya que son necesarios para la unión a la ADN-girasa.

Las diferencias estructurales entre las distintas quinolonas radican tanto en el número y posición de los átomos de nitrógeno como en las cadenas laterales y la presencia de flúor en su molécula. Las sustituciones en la posición 1 influyen en la afinidad por la ADN-girasa y, por tanto, en la actividad antibacteriana general. Las sustituciones en la posición 2 afectan a las propiedades farmacocinéticas. El grupo amino en posición 5 incrementa la actividad *in vitro* y favorece la absorción. La introducción de un átomo de flúor en posición 6 da lugar a un incremento en la inhibición de la ADN-girasa, potenciando la penetración en el interior de la bacteria,

originando una mayor acción antibacteriana sobre microorganismos gram negativos e incluyendo en su espectro a bacterias gram positivas. Este descubrimiento ha llevado a la búsqueda de nuevas quinolonas que incorporan un segundo átomo halogenado o de nitrógeno en posición 8, que pueden ser muy útiles por tener una mejor absorción oral. El grupo piperacínico heterocíclico en la posición 7, es el responsable de la penetración y de la posibilidad de administración parenteral.

2.1.2. Clasificación

2.1.2.1. Atendiendo a la estructura química

a) Naftiridonas: ácido nalidíxico y enoxacino.

b) Cinolonas: cinoxacino

c) Pirimidin-pirodonas: ácido pipemídico y ácido piromídico.

d) Quinolonas:

1.- Quinolonas no fluoradas: ácido oxolínico, acroxacino, miloxacino.

2.- Fluorquinolonas:

2.1. Monofluorquinolonas: flumequina, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, pefloxacino, amilofloxacino, irlofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, levofloxacino, gemifloxacino.

2.2. Difluorquinolonas: lomefloxacino, difloxacino, sparfloxacino, sitafloxacino.

2.3. Trifluorquinolonas: temafloxacino, fleroxacino, tosufloxacino, trovafloxacino.

2.1.2.2. Atendiendo a la aparición en clínica y comercialización.

La clasificación de King y cols (61) se basa en que las quinolonas de primera generación son activas frente a infecciones del tracto urinario, las de segunda generación mejoran la actividad frente a bacterias gram negativas, las de tercera generación son aquellas con actividad frente a bacterias gram positivas y patógenos atípicos y las de cuarta generación tienen actividad frente a anaerobios:

1.- Primera generación: ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, flumequina, etc.

2.- Segunda generación: ciprofloxacino, norfloxacino, enoxacino, pefloxacino, ofloxacino, etc.

3.- Tercera generación: sparfloxacino, gemifloxacino, moxifloxacino, levofloxacino, etc.

4.- Cuarta generación: trovafloxacino.

Otra clasificación formulada por Ball y cols (62) divide las quinolonas en cinco generaciones:

I.- Quinolonas utilizadas principalmente en infecciones del tracto urinario: ácido nalidíxico.

IIa.- Quinolonas con actividad predominante sobre gram negativos: ciprofloxacino.

IIb.- Quinolonas que mejoran su actividad sobre gram positivos: grepafloxacino.

IIIa.- Quinolonas con buena actividad sobre *S. pneumoniae*: moxifloxacino, trovafloxacino.

IIIb.-Quinolonas con muy buena actividad sobre *S. pneumoniae* y activos frente a patógenos respiratorios atípicos: gemifloxacino.

Actualmente en España están comercializadas seis fluorquinolonas: norfloxacino, ciprofloxacino, pefloxacino, ofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.

2.1.3. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción básico de las quinolonas es la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos, inhibiendo la ADN-girasa (topoisomerasa II) (63, 64). Esta enzima es la que corta la doble hélice del ADN cromosómico en fragmentos a los que superenrolla en sentido negativo, para posteriormente proceder al sellado de los extremos de ADN que fueron cortados.

Las quinolonas penetran en las bacterias a través de los canales acuosos de las porinas y luego por la membrana citoplasmática, sin que el paso sea afectado por el estado de la pared aunque sí por la temperatura. La entrada es pasiva, sin consumo de energía y no saturable (65). Las quinolonas hidrófobas es probable que pasen por liposolubilidad, al igual que los aminoglicósidos (66). En las bacterias gram positivas, que no tienen porinas ni lipopolisacáridos, el paso es por difusión simple.

Las quinolonas inhiben a la subunidad A de la enzima ADN-girasa (responsable de los cortes y de los cierres del ADN). Además también se ha probado que existe una acción sobre la subunidad B de la ADN-girasa (introduce los superenrollamientos negativos) (67, 68, 69, 70). De esta forma van a impedir la rotura y sobre todo el sellado de la cadena de ADN de doble hélice y en la formación de nuevos giros adicionales, con

lo que el ADN, demasiado expandido, no tiene suficiente espacio dentro de la bacteria (71). Las quinolonas actúan también sobre la topoisomerasa IV (72), enzima responsable de la separación de las hebras hijas de ADN durante la división celular. Se ha visto que en las bacterias gram positivas sobre todo en *S. pneumoniae*, la topoisomerasa IV suele la primera diana para casi todas las quinolonas (73, 74) y mientras que en las gram negativas la primera diana sería la topoisomerasa II y la segunda la topoisomerasa IV (75).

2.1.4. Mecanismos de resistencia

En general, la resistencia a fluorquinolonas se deben a modificación enzimática de las subunidades de la ADN-girasa (el principal), alteración de la permeabilidad de las porinas de la pared celular y por aumento de la expulsión del antibiótico mediante bombas de flujo.

Las alteraciones en la girasa bacteriana se producen por mutaciones en el gen que codifica la subunidad A de la ADN-girasa (gen *gyrA*), esencialmente en la región determinante de resistencia (QRDR), mutaciones en el gen que codifica la subunidad B de la ADN-girasa (gen *gyrB*), mutaciones en la topoisomerasa IV (gen *parC* y *parE*) (75, 76, 77).

Las alteraciones de los perfiles de proteínas de la membrana externa bacteriana con disminución de la permeabilidad de las porinas externas condicionan resistencia a las quinolonas (78). Se han descrito alteraciones en bacterias gram negativas como *Escherichia coli* (OmpC, OmpF) (79) y *Pseudomonas aeruginosa* (OprJ, OprN y OprM) (80).

El mecanismo de expulsión activa del antimicrobiano al exterior, llevado por bombas de eflujo, proteínas MexA-MexB-OprK y MexC-MexD-OprM (81), cuando está aumentado también determina resistencia a quinolonas. Está ligado a genes reguladores de multirresistencia en *P. aeruginosa*. Este mecanismo de expulsión también se ha observado en *S. aureus* (*norA*) (82) y en *S. pneumoniae* (*pmrA*) (83).

2.1.5. Factores que influyen en la actividad de las quinolonas.

La efectividad de las quinolonas puede modificarse tanto *in vivo* como *in vitro* por determinados factores, entre los cuales se destacan:

- **Inóculo:** el incremento del inóculo afecta de forma ligera a la actividad de las quinolonas fluoradas y de manera más acusada a las no fluoradas.

- **Medios de cultivo:** el comportamiento de las quinolonas es similar sea cual fuere el medio utilizado aunque se han encontrado algunas diferencias cuando comparamos medios con agar y medios líquidos (84).

- **pH:** de forma general puede afirmarse que la actividad de las fluorquinolonas disminuye progresivamente a medida que desciende el pH. Aunque las quinolonas antiguas suelen ser más activas a pH bajo (85, 86).

- **Iones:** hay una unanimidad en considerar que la eficacia antibacteriana disminuye en presencia de iones metálicos (84, 85) y se modifica más la actividad bactericida que la bacteriostática.

- **Suero:** las fluorquinolonas que tengan baja afinidad por las proteínas séricas, e su actividad apenas se ve modificada (85).

- **Orina:** el pH bajo y la mayor concentración de Mg^{++} en orina explican que algunas quinolonas presenten una reducción de la actividad en este medio.

2.2. Trovafloxacino

2.2.1. Estructura química

Trovafloxacino (CP-99,219) es una fluorquinolona sintética que puede emplearse por vía oral o intravenosa. Trovafloxacino se define como una 7-(3-azabicyclo (3,1,0) hexil)-naftiridona que tiene acción *in vitro* similar a la de las quinolonas de segunda generación en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y otros bacilos gram negativos aerobios, y posee dos características químicas estructurales muy importantes (figura 3):

-Un sustituyente 3-azabicyclo en C-7, que incrementa considerablemente la actividad frente a cocos positivos aerobios.

-Un grupo difluorofenil en posición N-1, que le confiere una buena eficacia sobre bacterias anaerobias (87, 88).

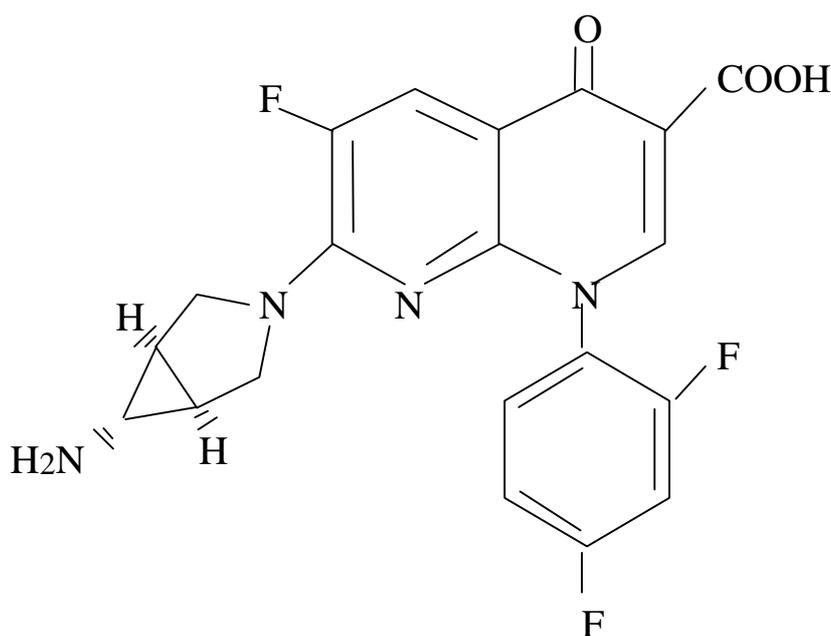


Figura 3. Estructura química de trovafloxacino

2.2.2. Mecanismo de acción

Como todas las quinolonas inhiben la síntesis de ácidos nucleicos a nivel de la ADN-girasa y topoisomerasa IV. En especial, la principal diana donde actúa trovafloxacino frente a *S. pneumoniae* es la topoisomerasa IV (74).

2.2.3. Espectro de acción

Trovafloxacino mantiene la buena actividad *in vitro* de las quinolonas de segunda generación sobre *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y otros bacilos gram negativos aerobios, pero es más activo frente a cocos gram positivos aerobios, incluidos *S. pneumoniae* resistente a penicilina (89, 90) y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (89, 91). También es 8 a 64 veces más activo que ciprofloxacino sobre las bacterias anaerobias (92, 93).

Trovafloxacino presenta una potente actividad frente a patógenos respiratorios importantes como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* (94), *Legionella pneumophila* (95), *Mycoplasma pneumoniae* (96). También presenta actividad frente a *Toxoplasma gondii* (97).

2.2.4. Farmacocinética

2.2.4.1. Absorción

En estudios farmacocinéticos se ha demostrado que trovafloxacino se absorbe rápidamente, con una biodisponibilidad del 88% (98). Las concentraciones máximas se alcanzan aproximadamente una hora después de la administración (99). Tanto las concentraciones máximas como las áreas bajo la curva son lineales y dependientes de la dosis y se mantienen básicamente estables tras la administración repetida, en intervalos de 24 horas (100). La presencia de comida no afecta a la cantidad de fármaco absorbida y no retrasa, o lo hace sólo ligeramente, la aparición del pico máximo de absorción (101, 102).

2.2.4.2. Distribución

Trovafloxacino presenta un volumen de distribución de 1,3 a 1,6 l/kg, valores que implican concentraciones tisulares adecuadas, característica de gran importancia cuando se valora la eficacia de los fármacos en el tratamiento de las infecciones por bacterias intracelulares. Las concentraciones que trovafloxacino alcanza en orina, pulmón y exudado inflamatorio están por encima de las CMI₉₀ para la mayoría de los patógenos sensibles, lo que propicia la investigación clínica en curso con pautas de administración cada 24 horas (103, 104, 105). A diferencia del resto de quinolonas,

trovafloxacino presenta concentraciones terapéuticas en líquido cefalorraquídeo (LCR) (106).

La unión a proteínas del fármaco es de aproximadamente un 70 %, mayor que la de otras quinolonas (107).

2.2.4.3. Eliminación

La vida media de eliminación de trovafloxacino es de 11 horas, significativamente mayor a la de ciprofloxacino, eliminándose por vía renal menos del 8 % del fármaco en forma inalterada. La depuración renal del fármaco (6%) es unas 10 veces menor que la de otras quinolonas, que se eliminan en un 40 % a 90 % de la dosis administrada en forma inalterada por la orina, mientras que los datos disponibles de trovafloxacino sugieren una eliminación preferente por heces (43%) (108).

2.2.5. Interacciones medicamentosas

Las interacciones mejor descritas son aquellas que se administran concomitantemente con cationes bi-trivalentes y la inhibición dependiente de quinolonas del metabolismo del citocromo P₄₅₀. (109, 110). En voluntarios sanos, las propiedades farmacodinámicas de warfarina, digoxina, cimetidina, omeprazol y teofilina no fueron afectadas por la administración simultánea de trovafloxacino (111, 112).

2.2.6. Efectos secundarios

Trovafloxacino se tolera bien en dosis oral de 100-300 mg. Tiene pocos efectos adversos en la dosis de 100 mg y en la dosis de 300 mg los efectos secundarios más importantes son los mareos y dolor de cabeza. No se ha observado cambios significativos en parámetros clínicos y hematológicos (113). Por el contrario se han encontrado reacciones de hepatotoxicidad después de ser comercializado el fármaco (114). Trovafloxacino muestra bajos niveles de efectos adversos relacionados con fotosensibilidad (115).

2.3. Gemifloxacino

2.3.1. Estructura química

Gemifloxacino (SB-265805) ó (LB-20304) es una nueva fluorquinolona que puede emplearse por vía oral. Gemifloxacino, ácido 7-(3-aminometil-4-metoxiimino-1-pirrolidin)-1ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-1,8-naftilidina-3-carboxilico metano sulfónico, es una mezcla racémica de dos equipotentes enantiómeros (116).

Esta quinolona presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias gram negativas y gram positivas, entre las que destaca su gran actividad frente a *S. pneumoniae*, debido a la presencia de un grupo pirrolidina en el carbono 7 (figura 4):

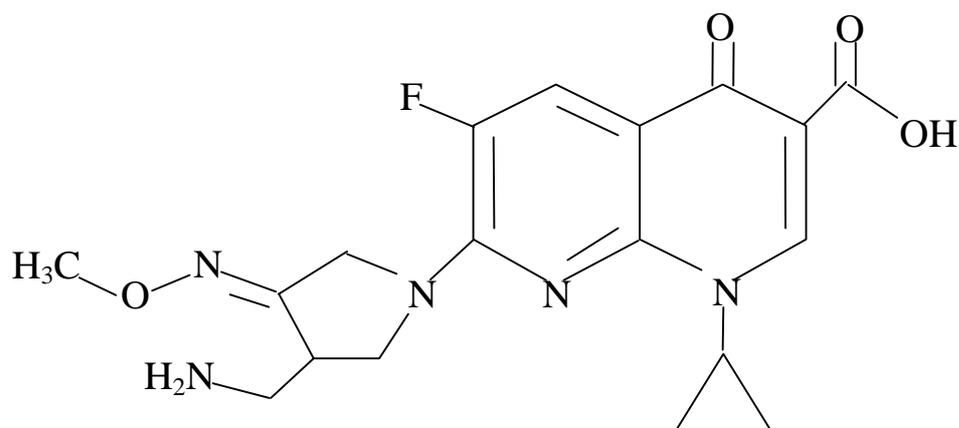


Figura 4. Estructura química de gemifloxacino

2.3.2. Mecanismo de acción

Como todas las quinolonas inhiben la síntesis de ácidos nucleicos a nivel de la ADN-girasa y topoisomerasa IV. En especial, la principal diana donde actúa gemifloxacino frente a *S. pneumoniae* es la topoisomerasa IV (117).

2.3.3. Espectro de acción

Gemifloxacino mantiene la buena actividad *in vitro* de las quinolonas frente a bacilos gram negativos aerobios (118), pero sobre todo destaca su gran actividad frente a *S. pneumoniae* siendo hasta 30 más activo que ciprofloxacino para este patógeno (119). También destaca su gran actividad frente a otros patógenos respiratorios como son *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* (120) y patógenos respiratorios atípicos como *Legionella*, *Mycoplasma* y *Chlamydia* (121, 122, 123) Respecto a las

bacterias anaerobias gram negativas, gemifloxacino presenta una actividad similar a sparfloxacino pero 16 veces inferior a trovafloxacino (124).

2.3.4. Farmacocinética

2.3.4.1. Absorción

En estudios farmacocinéticos se ha demostrado que gemifloxacino se absorbe rápidamente, con una biodisponibilidad del 70% (125). Las concentraciones máximas se alcanzan aproximadamente una hora después de la administración (125). Tanto las concentraciones máximas como las áreas bajo la curva son lineales y dependientes de la dosis y se mantienen básicamente estables tras la administración repetida, en intervalos de 24 horas (126). La presencia de comida lleva a un pequeño incremento (3%) en el área bajo la curva, una disminución en la concentración máxima (12%) y un incremento en tiempo en alcanzar la concentración máxima (0.75 horas). La administración de gemifloxacino simultánea a la de carbonato cálcico produce una reducción de un 20% en el área bajo la curva (127).

2.3.4.2. Distribución

Gemifloxacino presenta un volumen de distribución muy alto, 4.97 l/kg para una dosis de 320 mg, valores que sugieren una gran distribución en los tejidos siendo importante para valorar la eficacia de los fármacos en el tratamiento de las infecciones por bacterias intracelulares (126). Gemifloxacino alcanza concentraciones en orina (30 a 120 µg/ml) suficientes para eliminar a la mayoría de las bacterias gram negativas responsables de infecciones en el tracto urinario (125). La unión a proteínas del fármaco es de aproximadamente un 70 %.

2.3.4.3. Eliminación

La vida media de eliminación de gemifloxacino es de 6.65 horas, eliminándose por vía renal un 28-30% del fármaco aproximadamente en forma inalterada (125). Gemifloxacino es eliminado por vía renal y por mecanismos no renales como pueden ser la vía biliar.

2.3.5. Interacciones medicamentosas

En voluntarios sanos, las propiedades farmacodinámicas de warfarina, digoxina, omeprazol y teofilina no fueron afectadas por la administración simultánea de gemifloxacino (128, 129, 130, 131). Así no son necesarios ajustes de dosis cuando gemifloxacino es administrado junto con algunos de los fármacos citados anteriormente. Como otras quinolonas la toma concomitante de antiácidos con gemifloxacino interacciona en la absorción de gemifloxacino (132).|

2.3.6. Efectos secundarios

En estudios de voluntarios sanos gemifloxacino se tolera bien con una baja incidencia de efectos adversos (125, 126) En estudios clínicos en fase II, los efectos adversos más comunes fueron dolor de cabeza, náusea y dolor abdominal. Gemifloxacino muestra unos niveles de efectos adversos relacionados con la fotosensibilidad similar a ciprofloxacino siendo dependiente de la dosis (133).|

III. Objetivos

Debido a que la resistencia de *S. pneumoniae* a diferentes antimicrobianos está aumentando, en especial a penicilina y eritromicina, las nuevas quinolonas pueden ser una alternativa a los tratamientos clásicos. Sin embargo, en la actualidad se ha empezado a describir la presencia de *S. pneumoniae* resistente a ciprofloxacino y otras quinolonas, por lo que la búsqueda de nuevas quinolonas que mejoren la actividad frente a este patógeno debe ser una de las premisas a la hora de investigar nuevas moléculas.

Por otro lado, a la hora de determinar la eficacia de un determinado antimicrobiano hay que abordar la demostración *in vitro* de la capacidad de producir una disminución de la masa bacteriana y la extrapolación de dichos efectos a humanos. Así, para la evaluación de nuevas moléculas, hay que incluir la mayor cantidad de parámetros farmacocinéticos posible para poder plantear una serie de estudios que nos permitan relacionar dichos parámetros con la actividad antimicrobiana (CMI y CMB). Esto nos aproxima lo más posible a lo que ocurre *in vivo*, ya que la disminución de actividad *in vitro* no se acompaña necesariamente con una disminución de la eficacia terapéutica.

Como hemos comentado anteriormente, la reciente aparición e incremento de la incidencia de aislados clínicos de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino, ha suscitado el tema de cuáles son los mecanismos que permiten adquirir y diseminar esta resistencia dentro de las poblaciones de *S. pneumoniae*. La cuestión es si los aislados resistentes representan sólo un pocos tipos clonales o es un grupo de cepas con una diversidad genética que emerge a través de la presión selectiva antibiótica sobre los

clones existentes.

Estas dos alternativas tienen diferentes implicaciones para elegir cual es la intervención más apropiada para atajar el incremento en el número de aislados resistentes. La prevalencia de neumococos resistentes a ciprofloxacino ($\text{CMI} \geq 4\mu\text{g/ml}$) está mostrando signos de un incremento mundial. En Canadá, los aislados con susceptibilidad disminuida ha aumentado desde el 0% en 1993 al 1,7% en 1997 y 1998 (134), mientras que en Barcelona (España) el incremento ha sido incluso más pronunciado, desde 0,9% en 1991-1992 al 3,0% en 1997-1998 (135). En dos estudios multicéntricos (20 hospitales) llevados a cabo en España durante 1996-1997 (136) y 1998-1999 (137), la prevalencia de aislados resistentes a ciprofloxacino fue incluso mayor, 5,3% y 7,1% respectivamente.

Aunque hay muchos estudios dirigidos al conocimiento de los mecanismos de resistencia a las fluorquinolonas en el neumococo (138, 139, 140), los mecanismos de aparición y diseminación de los aislados resistentes nos son todavía bien conocidos.

Así, debido a las necesidades antes expuestas, nos proponemos los siguientes objetivos:

1.- Determinar la actividad *in vitro* de gemifloxacino y trovafloxacino frente a aislados de *S. pneumoniae* que presentan sensibilidad disminuida a ciprofloxacino.

2.- Estudiar la actividad bactericida sérica *ex vivo* medida como títulos bactericidas séricos y como tasa de muerte bacteriana tras la administración de dosis orales de gemifloxacino y trovafloxacino frente a un aislado de *S. pneumoniae* sensible

a penicilina y ciprofloxacino, y frente a un aislado resistente a penicilina y ciprofloxacino.

3.- Mediante curvas de letalidad, determinar el papel de los leucocitos PMN en la actividad bactericida sérica.

4.- Evaluar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos tras la administración de gemifloxacino y trovafloxacino.

5.- Estudiar el efecto del suero en la actividad de gemifloxacino y trovafloxacino sobre *S. pneumoniae*.

6.- Determinar el efecto postantibiótico (EPA) *in vitro* de gemifloxacino y trovafloxacino frente a *S. pneumoniae*.

7.- Mediante electroforesis de campo pulsado, determinar la caracterización molecular en aislados de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino.

8.- Estudiar el mecanismo de resistencia por bombas de expulsión en *S. pneumoniae* mediante hibridación con la sonda *pmrA*.

III. Material y métodos

1. Material

1.1. Microorganismos

Las cepas de *S. pneumoniae* utilizadas para la realización de estos estudios fueron recogidas de 2 estudios multicéntricos realizados en España durante 1996 a 1999 (137, 141). Los aislados fueron recogidos de infecciones en el tracto respiratorio adquiridas en la comunidad. Se conservaron en el congelador a -70°C hasta el momento de su utilización.

Para su recuperación se descongelaban y se realizaba una siembra de las mismas en placas de agar columbia (bioMérieux). Las placas así inoculadas se incubaban durante 24 horas en estufa (Heraeus) con atmósfera del 5% de CO_2 a 35°C .

1.2. Medios de cultivo

- Caldo Todd-Hewitt (Difco S.A).
- Agar columbia (bioMérieux S.A.).
- Caldo C + Y (pH=8)

1.3. Reactivos, compuestos químicos y biológicos

- Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), (Difco).
- Suero humano
- Tampón fosfato (50 mM KPO_4 pH7).
- Tampón de restricción (Tampón *SmaI* + β mercaptoetanol).
- Tampón *SmaI* (1M Tris pH8, 20 mM KCl, 6 mM MgCl_2)

- Tampón TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA) (Biorad Laboratories)
- Tampón de carga (azul de bromofenol, Xileno cianol FF, sucrosa)
- Agarosa Sea Plaque (FMC Products)
- Agarosa SeaKem LE (FMC Products)
- Solución EC-Lisis (RNAasa +1M Tris pH8, NaCl, 0,5 EDTA pH8, Deoxicolato sódico, Laurilsarcosina sódica, Brij 58 y agua)
- Solución ESP (Proteinasa K + EDTA, agua, sarcosil)
- Solución TE (1M Tris pH7,5, 0,5 EDTA pH8, agua)
- Solución de restricción (Tampón 4NEB, enzima *SmaI* y agua)
- Bromuro de etidio
- Marcador de sondas, Direct Labeling ECL System (Amersham Pharmacia Biotech).
- SSC (Citrato sódico, cloruro sódico, agua).
- Solución de hibridación (tampón de hibridación, agente bloqueante, NaCl)
- Tampón de lavado (Urea 6M, SDS, SSC, agua).

1.4. Antimicrobianos

Los antimicrobianos, trovafloxacino y gemifloxacino, utilizados en el ensayo fueron suministrados en forma de polvo valorada y fueron proporcionados por Smithkline Beecham S.A.(Madrid). Ciprofloxacino fue proporcionado por Bayer S.A.(Madrid)

Los fármacos presentaron las siguientes potencias: 846 µg/mg para ciprofloxacino, 1000 µg/mg para trovafloxacino y 754 µg/mg para gemifloxacino.

Todos los antimicrobianos se disolvieron en su solvente correspondiente, siguiendo las instrucciones del laboratorio farmacéutico para obtener soluciones madre que se alicuotaron en viales y se conservaron a -18°C hasta su utilización.

1.5. Leucocitos polimorfonucleares (PMN)

En los experimentos referentes a la valoración de la inmunidad se utilizaron leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) procedentes de sangre venosa periférica de donantes adultos sanos.

Para el aislamiento de los PMNs se utilizaron:

- Tubos EDTA potásico, para evitar la coagulación de la sangre a partir de la cual se aislaban los PMNs.
- Cloruro amónico (NH_4Cl), para inducir la lisis de los eritrocitos.
- HBSS, medio soporte de los PMNs.

En la comprobación de la viabilidad de los PMNs se utilizó Azul Tripan al 0,4%.

1.6. Instrumentos, aparatos y material fungible

Para la realización del ensayo se emplearon los siguientes instrumentos:

- Estufa a 35°C con 5% de CO_2 (Heraeus).
- Centrífuga (Selecta).
- Espectrofotómetro Hitachi U-1100.
- Pipetas automáticas.
- Autoclave.
- Placas Petri.

- Tubos de vidrio.
- Matraces.Asas de siembra.
- Pinzas.
- Espectofotómetro Spectronic 21 (Bausch&Lomb).
- Ultracentrifuga GS-GR Centrifuge (Beckman)
- Centrifuga 5415C (Eppendorf).
- Aparatos de electroforesis CHEF-DRII y DR-III (Biorad Laboratories).
- Cámara de fotos (Kodak).
- Sistema de vacío,Vacuum Gene Sistem (Pharmacia LKB Biotech).
- Membranas de nylon (Hybond-N+; Amersham).
- Fijador de ADN, DNA Stratalinker apparatus (Stratagene).
- Película autorradiográfica.
- Programa informático Whole-Band Analyzer (Bioimage).

2. Métodos

2.1. Estudio de sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae*.

2.1.1. Pruebas de sensibilidad

La susceptibilidad in vitro se determinó mediante un método semiautomático de microdilución, determinando las CMI y CMBs siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (142) excepto en la utilización de caldo Todd-Hewitt en lugar de caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes (143).

2.1.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Definimos la CMI como la concentración más baja de antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de forma visible a las 20-24 horas de incubación a 35°C.

Se realizó por el método de microdilución en caldo previamente descrito para aerobios (142) y en especial para *S. pneumoniae* (144) pero con la excepción de que se utilizó caldo Todd-Hewitt en lugar de Mueller-Hinton con sangre. Se utilizó un inóculo aproximado de 5×10^5 ufc/ml obtenido por el método de suspensión directa de colonias.

Las determinaciones se realizaron por triplicado, calculándose los valores modales de las CMI, a partir de los cuales se calcularon las correspondientes CMI₉₀. Se utilizó *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 como cepa control.

2.1.1.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Partiendo de las diluciones empleadas en la determinación de la CMI, se

tomaron 10 µl del tubo correspondiente a esta dilución, así como de las concentraciones superiores consecutivas. Se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero y se incubaron a 35°C con 5% de CO₂ durante 20-24 h. Como el caso de la CMI se realizó por triplicado.

Se define la CMB como la concentración correspondiente a la mayor dilución de antibiótico que inhibe el crecimiento del 99,9 % de los microorganismos.

2.1.2. Aislados clínicos

Para la realización de este estudio se emplearon 73 cepas de *S. pneumoniae* que fueron obtenidas de un estudio multicéntrico realizado en España entre 1996 y 1997. Los aislados fueron obtenidos a partir de pacientes con infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad. Los hospitales incluidos en el estudio fueron los siguientes:

- 1.- Hospital Clínico de Barcelona
- 2.- Hospital San Pablo de Bacerlona
- 3.- Hospital General de Santiago de Compostela
- 4.- Hospital Insular de las Palmas
- 5.- Hospital Clínico de Zaragoza
- 6.- Hospital La Paz de Madrid
- 7.- Hospital Virgen de las Nieves de Granada
- 8.- Hospital Gregorio Marañon de Madrid
- 9.- Hospital Virgen de Macarena de Sevilla
- 10.- Hospital Reina Sofia de Cordoba
- 11.- Hospital Clínico de Salamanca

12.- Hospital Clínico de Badajoz

13.- Hospital La Fe de Valencia

2.2. Determinación de la actividad bactericida sérica de gemifloxacino y trovafloxacino

2.2.1. Voluntarios

Se escogieron doce voluntarios sanos para la realización de un ensayo clínico en fase I. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital de la Paz (Madrid), obteniendo consentimiento informado de todos los voluntarios antes de su inclusión en el estudio. Los voluntarios recibieron dosis orales únicas de gemifloxacino (320 mg) y trovafloxacino (200 mg) separadas por un periodo de lavado de 14 días. Los voluntarios presentaron las siguientes características (media \pm desviación estándar): edad, $26,2 \pm 3,5$ años, altura, $175,2 \pm 4,7$ cm, peso, $73,2 \pm 4,2$ Kg. Se les realizó un examen físico que incluía un electrocardiograma y pruebas de laboratorio que incluían recuento de células sanguíneas y pruebas bioquímicas. Estas pruebas se realizaron antes de la entrada del sujeto en el estudio, antes y a las 24 horas después de cada dosis de antimicrobiano y una semana después de la administración del fármaco.

2.2.2. Administración de la dosis y toma de muestras

Durante cada periodo de dosificación, los fármacos fueron administrados con 300 ml de agua. La toma de muestra se realizó mediante la obtención de sangre venosa (8 ml) que fue recogida, antes de la administración del fármaco (0 h) y a las 1, 2, 4, 6, 8,

12, 16, 24, 36, 48 y 72 h después de la administración de cada fármaco. Estas muestras fueron utilizadas para la determinación de las concentraciones alcanzadas en suero y los títulos bactericidas séricos (TBS). Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos con EDTA como anticoagulante. De los 8 ml de sangre recogidos, 3 ml fueron utilizados para separar el plasma mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, siendo ubicado el plasma en tubos correctamente etiquetados. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -20°C hasta que se realizó la determinación de la concentración de fármaco por HPLC. Los 5 ml restantes de sangre venosa fueron utilizados para obtener suero para la realización del bioensayo, la determinación de los TBS. El suero fue separado y almacenado a -20°C hasta la determinación de los ensayos citados anteriormente. Además en los tiempos basal (-14 días), 1 y 24 horas, se recogieron 9 ml de sangre venosa que fueron utilizados para obtener suero para la determinación de la tasa de muerte *ex vivo* mediante curvas de letalidad con PMN. De los 9 ml anteriores, 5 ml se depositaron en tubos EDTA y fueron utilizados para la obtención de PMN.

2.2.3. Elección de las cepas

Para la determinación de la actividad bactericida sérica y el resto de estudios farmacodinámicas se escogieron dos cepas de *S. pneumoniae* del estudio de sensibilidad a gemifloxacino y trovafloxacino citado en el apartado 2.1. Las cepas escogidas presentaban las siguientes características: una cepa con serotipo 3 y sensible a penicilina y a ciprofloxacino, y la cepa 887 con serotipo 9, resistente a penicilina y a ciprofloxacino.

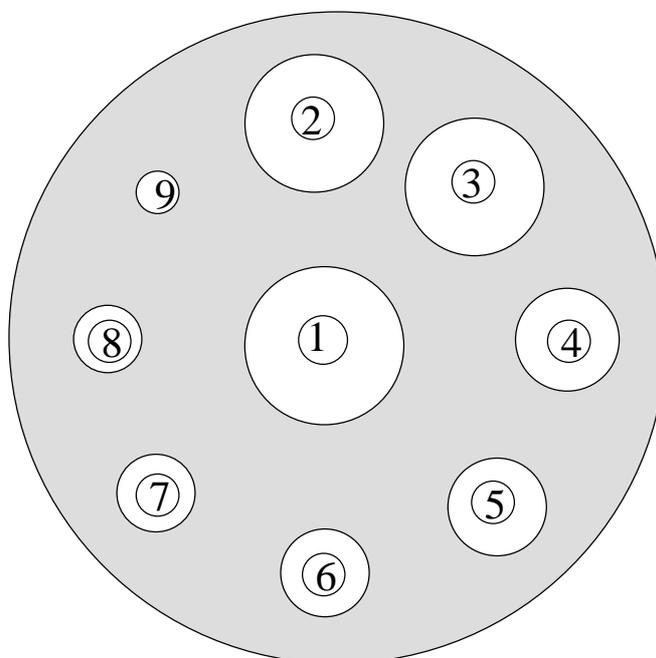
Para observar el efecto del suero humano en la sensibilidad *in vitro* de los

fármacos se realizaron las CMI en presencia de un 80% de suero (suero basal de los voluntarios) y 20% de caldo Todd-Hewitt. Se realizó por triplicado para las dos cepas del ensayo y se calculó el valor modal de la CMI con suero.

2.2.4. Determinación de las concentraciones séricas de gemifloxacino y trovafloxacino por método microbiológico (bioensayo)

La concentración en suero de gemifloxacino y trovafloxacino fueron determinadas utilizando el método de bioensayo de tres dimensiones (145). Para ello, se empleó agar Müller-Hinton mezclado a 50°C con esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (microorganismo indicador). Las CMI de gemifloxacino y trovafloxacino frente al microorganismo indicador fue de 0,0035 µg/ml. El agar fue depositado en placas Petri de 15 cm de diámetro (20 ml por placa). Después de la solidificación, se colocaron en el agar 12 discos (7mm de diámetro, Difco) sobre la superficie del agar, y se añadió a cada disco 20 µl de cada muestra de suero perteneciente a los diferentes tiempos de recogida (0 a 72 h) (figura 5). Todas las muestras de un voluntario fueron colocadas en la misma placa, realizado este procedimiento por triplicado. A continuación las placas fueron incubadas a 37°C durante 18-24 h, midiendo posteriormente la zona de inhibición de todos los discos con un calibrador electrónico (Sylvac Ultra-Cal II, Fowler Scientific).

Figura 5. Esquema de colocación de los discos para la realización del bioensayo.



Las curvas patrón fueron realizadas de forma paralela, colocando 11 discos en agar sembrado con el microorganismo y añadiendo 20 μ l de suero humano (pool de los voluntarios) con concentraciones conocidas de gemifloxacino y trovafloxacino. Estas concentraciones fueron diluciones dobles desde 0,01 a 12,5 μ g/ml. Estas curvas patrón se realizaron por triplicado (tres placas por cada antimicrobiano).

Las curvas patrón fueron construidas mediante la representación en gráficas enfrentando el diámetro de la zona de inhibición y el logaritmo de las concentraciones de antimicrobiano. Se realizó un análisis de regresión utilizando el programa de estadística SPSS 9.0 para obtener la recta que mejor se ajustase. Se calculó la media de

las tres medidas de los diámetros de las zonas de inhibición de cada muestra y se utilizó para obtener los resultados de la concentración de antimicrobiano extrapolando en la curva patrón.

El límite de detección para gemifloxacino y trovafloxacino fue de 0,02 y 0,05 µg/ml, respectivamente. La reproducibilidad para gemifloxacino y trovafloxacino fue de 1.85 % y 2.05 %, respectivamente.

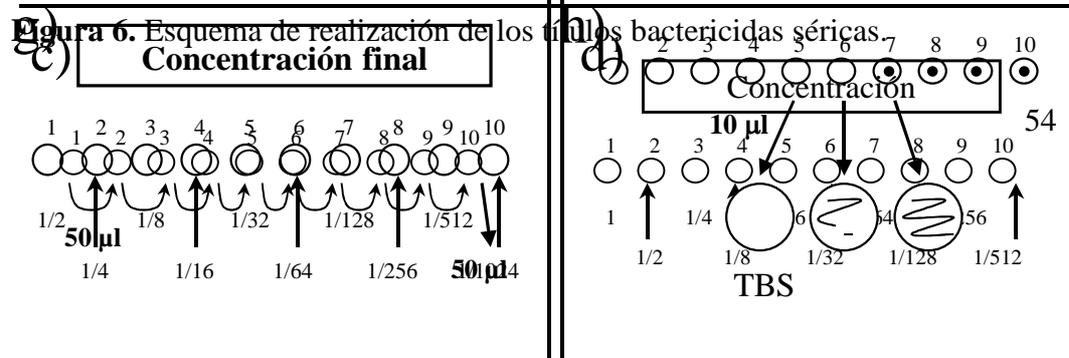
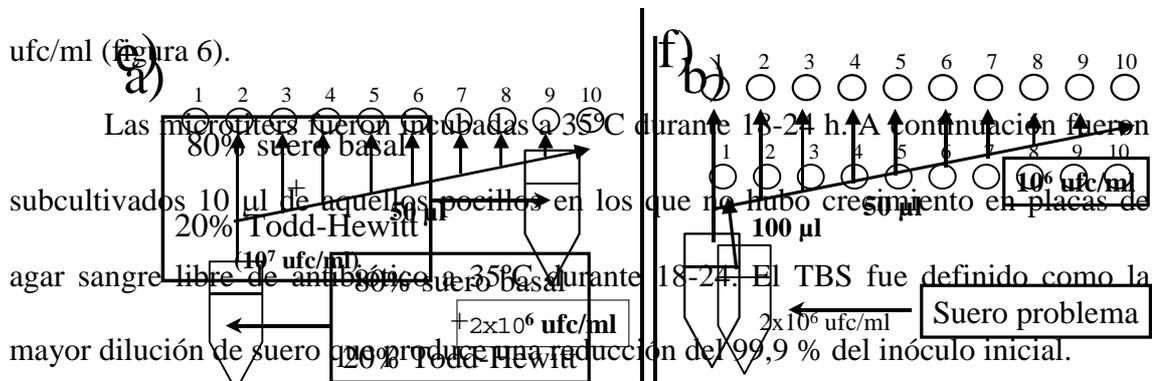
2.2.5. Determinación de las concentraciones plasmáticas de gemifloxacino y trovafloxacino por HPLC

La determinación de las las concentraciones en plasma de gemifloxacino y trovafloxacino por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) fueron realizadas por el Dr. Fritz Soergal del Departamento de Análisis de Fármacos de SmithKline Beecham en Alemania. Así, gemifloxacino y trovafloxacino fueron aislados del plasma humano utilizando un método basado en la precipitación de proteínas con acetonitrilo. Las muestras fueron analizadas con HPLC/MS/MS operando en modo de ion positivo y utilizando un interface Turbo Ionspray. Se utilizaron muestras de 50 µl, siendo el límite menor de cuantificación de 0,01 µg/ml para trovafloxacino y de 0,025 µg/ml para gemifloxacino. Se emplearon tres controles de calidad por cada tres concentraciones dentro del rango de calibración con cada batch de las muestras experimentales. Los resultados de las muestras de los controles de calidad fueron utilizados para asegurar la realización y fiabilidad del ensayo.

2.2.6. Determinación de los títulos bactericidas séricos (TBS)

Los títulos bactericidas séricos (TBS) fueron determinados frente a las dos cepas citadas anteriormente usando el método de microdilución (146). Las muestras de suero (100 µl) recogidas a los diferentes tiempos del estudio (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72 horas) fueron depositadas en el primer pocillo de las placas microtiter y a continuación fueron diluidas, pasando 50µl de pocillo en pocillo, con suero basal (pool de muestras de sueros obtenidas de los voluntarios antes de la administración de los fármacos) y un 20 % de caldo Todd-Hewitt (Difco), quedando de momento 50µl en los pocillos (figura 6).

Para la realización del inóculo se llevaron colonias a un matraz que contenía caldo fresco Todd-Hewitt. Este cultivo se hacía crecer a 35°C hasta alcanzar una absorbancia a 580 nm de 0,11, lo que equivalía a una concentración bacteriana de, aproximadamente, 10^8 UFC/ml. Se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de 10^7 UFC/ml y a continuación se incluyó un 80% de suero basal. A continuación fueron depositados 50µl en los diferentes pocillos hasta obtener un volumen final en cada pocillo de 100 µl y un inóculo final de aproximadamente de 10^6 ufc/ml (figura 6).



2.2.7. Determinación de la tasa de muerte *ex vivo* de *S. pneumoniae*, en sueros de voluntarios (en presencia y ausencia de leucocitos polimorfonucleares) tratados con gemifloxacino y trovafloxacino.

Para la realización de la tasa de muerte en el tiempo basal (-14 días), 0 y 24 horas después de la dosis, se realizaron los siguientes procesos:

2.2.7.1 Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Los PMN de sangre periférica extraída de cada voluntario sano y anticoagulada en tubos de EDTA potásico, se aislaron por el método de centrifugación diferencial descrito por Paul Egleton y cols (147).

A 5 ml de sangre anticoagulada en tubos EDTA se le añadían 16 ml de cloruro amónico frío (pH 7,4). Se mezcló bien y se mantuvo en hielo durante 15 minutos para permitir la hemólisis de los eritrocitos. Esta suspensión celular se centrifugó a 160 x g durante 10 minutos en contenedores universales de poliestireno de fondo cónico (25 mm x 90 mm). Una vez centrifugado, las células rojas hemolizadas (sobrenadante) fueron descartadas, resuspendiéndose el sedimento de leucocitos en cloruro amónico. A continuación se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Gibco BRL). Las células fueron centrifugadas nuevamente a 55 x g durante 10 minutos. El sedimento de PMN resultante tras la eliminación del sobrenadante se resuspendió en 1 ml de HBSS y se mantuvo a 4 °C hasta su utilización en las curvas de muerte bacterianas con PMN.

2.2.7.2. Recuento y ajuste de leucocitos polimorfonucleares (PMN)

La determinación del número de PMNs se realizó en cámara de Neubauer. Se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

1. Número de leucocitos contados: es la media del número de PMN en los cuatro cuadrantes de la parte superior de la cámara y de los cuatro cuadrantes de la parte inferior.
2. Corrección de volumen: considerando que cada cuadrante de la cámara tiene unas dimensiones de 1 x 1 x 0,1, y por tanto un volumen de 0,1 mm³. Como los leucocitos han sido contados en los cuatro cuadrantes, el volumen total considerado será de 0,4 mm³. Para obtener un volumen de 1 mm³ debe multiplicarse 0,4 por 2,5, que es el factor de corrección de volumen.
3. Corrección de dilución: debido a que las células habían sido diluidas al 1:10, el factor de corrección de la dilución será igual a 10.
4. Recuento final: $\text{PMN/ mm}^3 = \text{n}^\circ \text{ de leucocitos contados} \times \text{corrección de volumen} \times \text{corrección de dilución}$. Para obtener el número de PMN por ml, el resultado de la operación anterior se multiplica por 1000.

Para nuestro ensayo necesitábamos una concentración determinada de PMN que mantuviera una relación con las bacterias de 10:1, así que, inmediatamente antes del experimento, los PMN se ajustaron a una concentración de 10⁷ PMN/ml

2.2.7.3. Estudio de la viabilidad de celular

La viabilidad de los PMN se determinó por exclusión del colorante vital azul de tripan al inicio y al final del experimento. El recuento de células blancas se realizó en cámara de Neubauer. Estas preparaciones debían contener más de 95% de células blancas viables al principio de cada experimento.

2.2.7.4. Determinación de las curvas de letalidad

Para la realización de las curvas de letalidad fue necesario descongelar las cepas y realizar siembras en placas de agar sangre. Las placas así inoculadas se incubaban durante 24 horas en estufa con atmósfera del 5% de CO₂ a 35°C.

Del neumococo crecido en estas placas, como previamente se ha explicado, se tomaban unas colonias y se llevaban a un matraz que contenía caldo fresco Todd-Hewitt. Este cultivo se hacía crecer en un baño de agitación a 35°C hasta alcanzar una absorbancia a 580 nm de 0,11, lo que equivalía a una concentración bacteriana de, aproximadamente, 10⁸ UFC/ml. Una vez realizados los pasos anteriores teníamos todos los componentes necesarios para el desarrollo del ensayo. El inóculo se añadía entonces a tubos estériles que contenían las siguientes mezclas:

1. Caldo + microorganismo, (C).
2. Caldo + microorganismo + PMN, (P)
3. Caldo + microorganismo + suero, (S)
4. Caldo + microorganismo + suero + PMN, (SP).

El volumen final de cada tubo era de 2 ml y el porcentaje de suero utilizado fue

del 80%. Debido a la dilución en el tubo de 2 ml y teniendo en cuenta que nuestra relación final entre bacterias y PMN fue de 10:1, las concentraciones finales fueron de 10^7 UFC/ml y 10^6 PMN/ml, respectivamente.

De tal modo que cada tubo, rotulado como sigue, contenía las proporciones que se indican de cada componente:

	Microorganismo	Suero + ATB	HBSS	PMN
C	200 μ l	-	1800 μ	-
P	200 μ l	-	1600 μ l -	200 μ l
S	200 μ l	1600 μ l	200 μ l	-
SP	200 μ l	1600 μ l		200 μ l

Los tubos del ensayo se incubaron a 35°C en baño de agitación durante las 3 horas que duró el mismo.

Se tomaron alícuotas a tiempos 0, 1, 2 , 3 horas, y se realizaban diluciones seriadas decimales en tubos. Estos contenían solución salina (0,9%), excepto el primero de la batería, que contenía agua básica estéril (pH= 10,8), para romper los leucocitos y liberar las bacterias intracelulares (148). De este modo se obtenía una serie de tubos que contenía cada uno 10 veces menos concentración de bacterias que el anterior.

El recuento de células viables se hacía en placas de agar sangre. Para ello se sembraban 20 μ l de cada uno de los tubos de la batería en dichas placas. Tras 24 horas de incubación a 35°C en estufa con atmósfera del 5% de CO₂, se procedía al cómputo de

las colonias y se obtenía el número de UFC/ml, y la concentración bacteriana a cada tiempo. Se realizó el recuento de colonias mediante la expresión:

$$\text{N}^\circ \text{ colonias} \times \text{factor ajuste unidades (50)} \times \text{dilución (10}^x\text{)} = \text{ufc/ml}$$

x= número de dilución seriada.

2.3. Determinación del efecto postantibiótico (EPA) de gemifloxacino y trovafloxacino frente a *S. pneumoniae* con diferentes concentraciones (1, 4, 10 x CMI).

El efecto postantibiótico (EPA) es la supresión del crecimiento bacteriano que persiste tras la exposición de un microorganismo a un fármaco (149). Para comprobar la existencia de EPA se determina la cinética de crecimiento bacteriano una vez eliminado el antimicrobiano del medio de cultivo. En estas condiciones el EPA se define como la diferencia en el tiempo (horas) que se requiere para que el recuento de UFC en un cultivo problema aumente 1 log₁₀ tras eliminar el antimicrobiano, y el tiempo requerido para que el número de UFC en un cultivo control aumente también 1 log₁₀ con respecto al recuento observado inmediatamente antes de completar el mismo procedimiento empleado con el cultivo problema (150).

La cuantificación del EPA se realizó sometiendo a un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento (10⁷ UFC/ml aproximadamente) a la acción de concentraciones de antimicrobiano 1 x CMI, 4 x CMI y 10 x CMI, comparando después con un control.

Todos los cultivos bacterianos fueron expuestos a la acción de las diferentes

concentraciones de los antibióticos durante 1 hora, excepto el cultivo control, que siguió el mismo protocolo pero libre de fármaco. Finalizado el tiempo de exposición los antimicrobianos fueron eliminados mediante técnicas de dilución (151).

En un matraz con 25 ml de caldo Todd-Hewitt se depositaron unas colonias de neumococo. Este cultivo se incubó hasta alcanzar una concentración bacteriana de 10^7 UFC/ml, momento en el que el microorganismo fue expuesto a la acción del antimicrobiano a la concentración correspondiente. Se mantuvo un matraz libre de antibiótico como control.

Todos los matraces se incubaron en baño de agitación durante 1 hora. Tras este tiempo se procedió a eliminar el antibiótico de los matraces mediante dilución 1:1000 (151). Como diluyente se utilizó caldo fresco Todd-Hewitt siguiendo el mismo el mismo protocolo para el control.

Los cultivos lavados y libres de antimicrobiano se incubaron durante 6 horas a 35°C. Se tomaron alícuotas (200 μ l) de los mismos, realizándose recuentos bacterianos a cada hora, desde el tiempo 0 (momento de la dilución) y hasta la 6ª hora (momento en que se observó recrecimiento). Se realizó el recuento de colonias mediante la expresión comentada en apartados anteriores.

Todo este protocolo se realizó por triplicado para todos los antimicrobianos ensayados.

El cálculo de la duración del EPA se efectuó mediante la ecuación (152):

$$\mathbf{EPA = T - C}$$

donde T es el tiempo en horas que tarda el cultivo de microorganismos tratados

en incrementar 1 \log_{10} su concentración a partir del tiempo 0 (eliminación del antimicrobiano), y C es el tiempo en horas que tarda el cultivo control en incrementar 1 \log_{10} su concentración a partir del tiempo 0.

La duración del EPA se tomó como la media de los tres experimentos y se consideró significativo si era superior a 30 minutos (149).

2.4. Determinación de la influencia de suero en la sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae*.

2.4.1. Pruebas de sensibilidad

La sensibilidad *in vitro* se determinó mediante un método semiautomático de microdilución, determinando las CMI y CMBs siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (142) excepto en la utilización de caldo Todd-Hewitt en lugar de caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre.

2.4.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Definimos la CMI como la concentración más baja de antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de forma visible a las 20-24 horas de incubación a 35°C. Se realizó por el método de microdilución en caldo previamente descrito en el apartado 2.1. Para evaluar la presencia de suero se utilizó un 80% de suero humano ("pool" de suero obtenido de donantes sanos que no habían recibido tratamiento en el mes previo) y un 20% de caldo Todd-Hewitt. Se utilizó un inóculo aproximado de 5×10^5 ufc/ml obtenido por el método de suspensión directa de colonias.

Las determinaciones se realizaron por triplicado, calculándose los valores modales de las CMI, a partir de los cuales se calcularon las correspondientes CMI₉₀. Se utilizó *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 como cepa control.

2.4.1.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Partiendo de las diluciones empleadas en la determinación de la CMI, se tomaron 10 µl del tubo correspondiente a esta dilución, así como de las concentraciones superiores consecutivas. Se sembraron en placas de agar con 5% de sangre de cordero y se incubaron a 35°C con 5% de CO₂ durante 20-24 h. Como el caso de la CMI se realizó por triplicado. Se define la CMB como la concentración correspondiente a la mayor dilución de antibiótico que inhibe el crecimiento del 99,9 % de los microorganismos.

2.4.2. Asilados clínicos

Se determinó la susceptibilidad a ciprofloxacino, trovafloxacino y gemifloxacino de sesenta aislados recientes de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes adultos con infección respiratoria adquirida en la comunidad en España, y recogidos en un estudio nacional de vigilancia epidemiológica (1998-1999) (137). Los hospitales incluidos en el estudio fueron los siguientes:

- 1.- Hospital Clínico de Barcelona
- 2.- Hospital General de Santiago de Compostela
- 3.- Hospital Insular de las Palmas
- 4.- Hospital Clínico de Zaragoza

- 5.- Hospital La Paz de Madrid
- 6.- Hospital Virgen de las Nieves de Granada
- 7.- Hospital Gregorio Marañón de Madrid
- 8.- Hospital Virgen de Macarena de Sevilla
- 9.- Hospital de las Cruces de Baracaldo
- 10.- Hospital Clínico de Salamanca
- 11.- Hospital Nuestra Señora de Alarcos de Ciudad Real
- 12.- Hospital Marqués de Valdecilla de Santander
- 13.- Hospital Virgen de Arreixaca de Murcia
- 14.- Hospital Dr Pesset de Valencia
- 15.- Hospital Nuestra Señora de Aranzazu de San Sebastian
- 16.- Hospital de San Juan de Barcelona

2.5. Estudio para la caracterización molecular de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino.

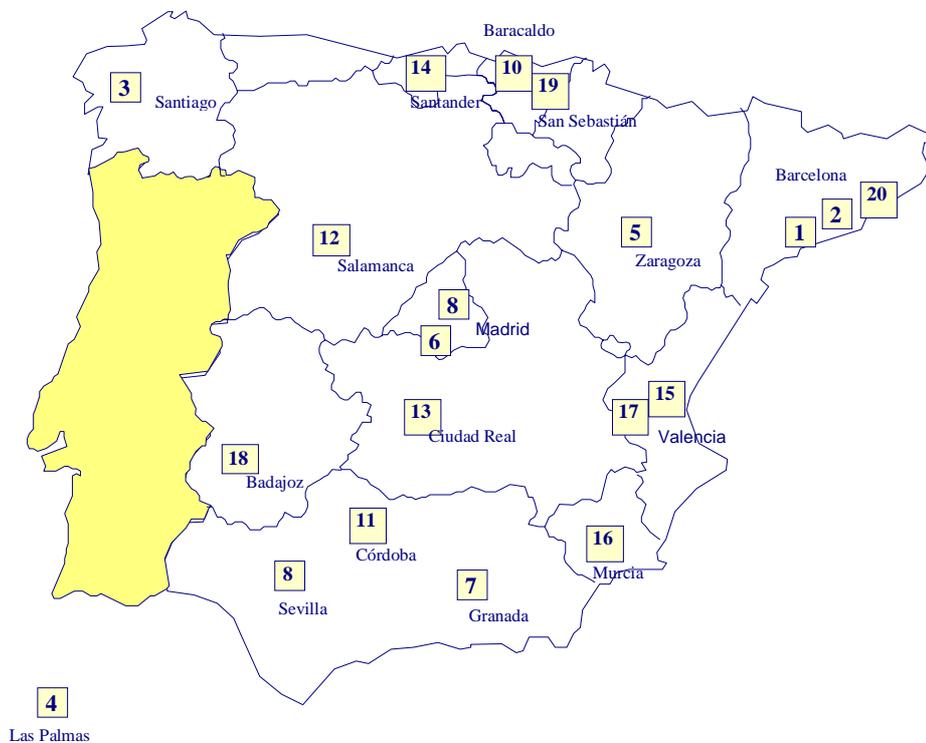
Para la realización de este estudio se utilizaron 172 aislados clínicos de *S. pneumoniae* que fueron seleccionados a partir de dos estudios realizados en España (137, 141). Las cepas fueron obtenidas durante 1996 a 1999 en 20 hospitales diferentes a partir de pacientes con infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad.

Los hospitales incluidos en el estudio fueron los siguientes (figura 7):

- 1.- Hospital Clínico de Barcelona
- 2.- Hospital San Pablo de Bacerlona
- 3.- Hospital General de Santiago de Compostela

- 4.- Hospital Insular de las Palmas
- 5.- Hospital Clínico de Zaragoza
- 6.- Hospital La Paz de Madrid
- 7.- Hospital Virgen de las Nieves de Granada
- 8.- Hospital Gregorio Marañón de Madrid
- 9.- Hospital Virgen de Macarena de Sevilla
- 10.- Hospital de las Cruces de Baracaldo
- 11.- Hospital Reina Sofía de Córdoba
- 12.- Hospital Clínico de Salamanca
- 13.- Hospital Nuestra Señora de Alarcos de Ciudad Real
- 14.- Hospital Marqués de Valdecilla de Santander
- 15.- Hospital La Fe de Valencia
- 16.- Hospital Virgen de Arrixaca de Murcia
- 17.- Hospital Dr Pesset de Valencia
- 18.- Hospital Clínico de Badajoz
- 19.- Hospital Nuestra Señora de Aranzazu de San Sebastián
- 20.- Hospital de San Juan de Barcelona

Figura 7. Distribución geográfica de los diferentes hospitales participantes en el estudio.



De los 179 aislados resistentes a ciprofloxacino obtenidos durante el periodo que abarca los dos estudios 1996/1999, 82 fueron seleccionados para el tipado molecular. Todos excepto 5 de los 82 aislados fueron aislados en adultos: 63 del tracto respiratorio; 14 de hemocultivo; y 5 del oído medio. Otros 90 aislados fueron seleccionadas entre las cepas sensibles a ciprofloxacino CMI = 1 µg/ml de los estudios citados anteriormente en los mismos periodos de tiempo y en los mismo lugares que las cepas resistentes. La mayoría de estos, 70 fueron aislados en el tracto respiratorio; 22 de hemocultivo y 12 del oído. Las cepas sensibles a ciprofloxacino fueron seleccionadas para poder comparar lo mejor posible las características de las cepas resistentes a ciprofloxacino en términos del perfil de resistencia antimicrobiano y el serogrupo.

El ADN total de las cepas fue tratado para obtener fragmentos de ADN, generados por la enzima de restricción y separados por electroforesis de campo pulsado (PFGE = pulse field gel electrophoresis) utilizando el método de Soares y cols (153). Este protocolo se utilizó para todas las cepas y consistió en los siguientes pasos:

2.5.1. Preparación de los discos de neumococos

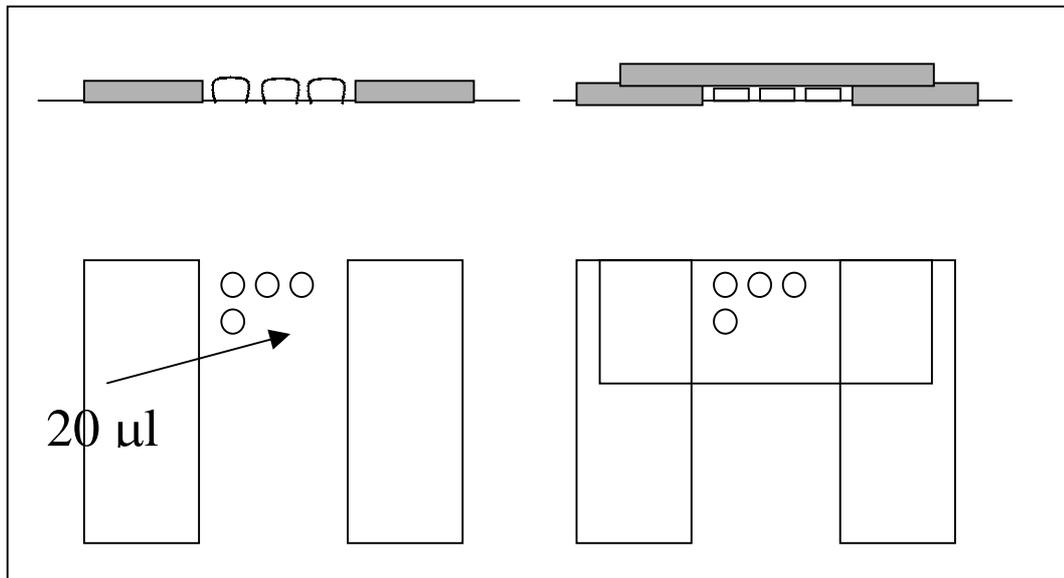
Se inóculó 60 µl de la cepa descongelada en 6 ml de caldo C+Y (pH=8) hasta que alcanzó la fase logarítmica una densidad óptica a 620 nm de 0,7-0,9, medida en el espectrofotómetro Spectronic 21 (Bausch&Lomb). A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm a 4°C (GS-GR Centrifuge, Beckman). Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato (50 mM KPO₄ pH7). Se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos (Centrifuge 5415C, Eppendorf).. Se volvió a desechar el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de tampón fosfato (volumen total aproximado = 240 µl). Se ajustó la concentración cogiendo 5 µl en 1 ml de tampón fosfato y midiendo la densidad óptica a 620 nm de ese ml para introducirla en la siguiente fórmula:

$$V \text{ a añadir (ml)} = (\text{Densidad óptica-620 nm} \cdot 40 \cdot 240) - 240,$$

donde 40 es el factor de dilución (1 ml / 5 µl). Una vez ajustada la concentración bacteriana se cogieron 150 µl se colocaron en un tubo eppendorf a 41°C, donde se añadieron otros 150 µl de agarosa LMP (low melting point) (Sea Plaque, FMC Products) al 1,5% en tampón fosfato. Se mezclaron por agitación en el vortex y se colocaron 10 a 12 gotas de 20 µl sobre una superficie de vidrio envuelta en parafilm, colocando un portaobjetos encima para dar forma a los discos y dejando que se

solidifiquen a temperatura ambiente o manteniéndolos a -20°C durante 5 minutos (ver figura 8).

Figura 8. Preparación de los discos para el PFGE.



Se incubaron los discos en tubos con 1 ml de solución EC-Lisis durante 3 horas a 37°C para activar la lisis por la acción de los detergentes y destruir el ARN por la ARNasa que posee. Después se desechó la solución anterior y se incubaron los discos en 1ml de solución ESP durante 17 horas a 50°C . Esta solución tiene proteinasa K del hongo *Tritirachium album* (Boehringer Mannheim) cuya función es eliminar las proteínas. A continuación para realizar el lavado, se desechó la solución anterior y se colocaron los discos en 13 ml de solución TE durante 1 hora a temperatura ambiente. Este proceso de lavado se repitió hasta 3 veces.

2.5.2. Restricción de los discos

Se realizó el paso de un o dos discos a un tubo eppendorf con 500 µl del tampón de restricción y se incubó a 25°C (temperatura de restricción) durante una hora. A

continuación se eliminó el tampón de restricción y se añadieron 45 µl de la solución de restricción que contiene 15 Unidades de la enzima *SmaI* (New England Biolabs) y tampón 4 x NEB (New England Biolabs) . Se incubó durante 4 horas a 25°C hasta que se añadió 5 µl del tampón de carga, con azul de bromofenol.

2.5.3. Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Para la realización de la electroforesis los discos fueron introducidos en los pocillos previamente creados con un peine en un gel de agarosa 1% (SeaKem LE, FMC Products) con tampón 0,5 x TBE (Biorad Laboratories). Además también se utilizaron discos de marcadores moleculares (Lambda ladder, New England Biolabs). La electroforesis de campo pulsado se llevó a cabo en aparatos CHEF-DRII y DR-III (Biorad Laboratories) donde el gel estaba sumergido en el tampón 0,5 x TBE. Las características de la electroforesis fueron las siguientes:

- Temperatura: 11,3°C
- Tiempo. 23 horas
- Pulso inicial: 5 segundos
- Pulso final: 35 segundos
- Potencia: 6 V/cm
- Velocidad de recirculación del tampón: 70

2.5.4.- Tinción y fotografiado

Los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio, sumergiendo el gel en 250 ml de agua bidestilada con 15 µl de bromuro de etidio, y fueron fotografiados.

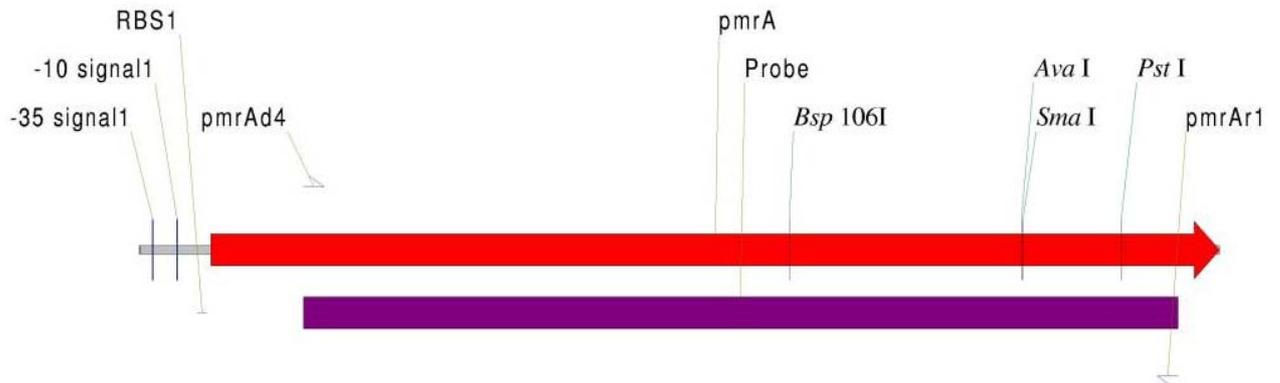
Los diferentes patrones obtenidos por PFGE fueron asignados por inspección visual de los perfiles de macro-restricción utilizando los criterios aceptados (154).

2.6. Estudio de hibridación con una sonda del gen *pmrA*.

El protocolo que se utilizó para realizar la hibridación con la sonda del gen *pmrA* consistió en los siguientes pasos (155):

2.6.1. Elaboración de la sonda

La sonda para el gen *pmrA* fue elaborada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como ADN “template” la cepa R36A y los primers o cebadores: *pmrAr1*-GACA ACTAAAGGCAACACAAAGGC y *pmrAd4*-TCTAGGTGTAGGGAGTCAGCAAGTC seguido por un método descrito previamente (140). La sonda abarca desde el nucleótido 194 al 1233 del acceso AJ007367 e incluye un sitio de restricción para la enzima *SmaI* site en la posición 1047-1052 (acceso AJ007367).

Figura 9. Esquema de la sonda con sus cebadores del gen *pmrA* (1283 pb).

Para la realización de la PCR se utilizó: 10 x tampón PCR, desoxinucleotidos dNTP (10mM), MgCl₂, y la polimerasa Taq (Amplificate gold) 5 U/μl. Se añadió al ADN de la cepa R36A previamente cuantificado junto con los primers. Los tiempos y la temperatura empleadas fueron las siguientes:

- Predesnaturalización: 95°C 10 minutos
- Desnaturalización: 94°C 45 segundos (30 ciclos)
- Hibridación 45°C 40 segundos (30 ciclos)
- Extensión: 72°C 1 minuto (30 ciclos)

2.6.2. Transferencia del ADN por Southern blot.

Los fragmentos de ADN separados por PFGE fueron transferidos a membranas de nylon (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech), utilizando el sistema de vacío,

Vacuum Gene System (Pharmacia LKB Biotech). Se colocó el gel encima del papel en el sistema de vacío con una presión de 40 psi y se depositó HCl 0,25 M por encima del gel hasta cubrirlo durante 5 minutos para romper el ADN. A continuación se eliminó el HCl y se depositó Tris 0,5 M pH7 durante 30 minutos. Una vez eliminada la solución anterior se colocó NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M durante 2 horas para desnaturalizar. Luego se eliminó la solución anterior y se lavó la membrana con 5x SSC y se dejó secar la membrana entre papel de 3 mm. Se fijó el ADN a la membrana mediante radiación ultravioleta (UV) exponiendo la membrana a 12.000 μ Julios (DNA Stratalinker apparatus, Stratagene).

2.6.3. Preparación de la sonda marcada

La sonda fue marcada con el sistema Direct Labeling ECL System (Amersham Pharmacia Biotech), como recomendaba el fabricante. Para ello el ADN que se quiere marcar se diluye en agua a una concentración de 10 ng/ μ l, incluyendo las sondas para los marcadores lambda. Se desnaturaliza el ADN mediante calentamiento en agua hirviendo durante 5 minutos para pasar rápidamente otros 5 minutos a hielo. A continuación se centrifuga y se añaden cantidades iguales de reactivo marcador (peroxidasa) y del ADN que queremos marcar y a continuación se añaden cantidades iguales de glutaraldehído, que permite la unión del ADN a la peroxidasa, y el ADN que queremos marcar. De esta forma obtenemos la sonda del gen *pmrA* marcada.

2.6.4. Hibridación de la sonda

Las membranas fueron hibridadas con la sonda de ADN marcada con el sistema Direct Labeling ECL System (Amersham Pharmacia Biotech), como recomendaba el fabricante. Así, las membranas se introducen en los tubos enrolladas y fueron lavadas con 5x SSC (solución de citrato sódico y cloruro sódico) a 42°C durante 15 minutos con agitación constante. Se incubó la solución de hibridación durante al menos 30 minutos y se mezcla en un tubo eppendorf con la sonda anteriormente preparada. La solución de hibridación presenta un agente bloqueante que es una proteína que se va a unir a la membrana dejando libre solo las zonas que presentan ADN y así la sonda se une solo al ADN y no a toda la membrana. Esta solución de hibridación con la sonda se introduce en el tubo donde está la membrana agitándose y se deja durante toda la noche a 42°C.

Al día siguiente, se elimina la solución de hibridación y se lava con 5 x SSC durante 10 minutos y a continuación una vez eliminado este se vuelve a lavar con el tampón de lavado, que va a eliminar de la membrana todas aquellas proteínas y ADN que no haya quedado unido a la membrana, durante 20 minutos a 42°C, dos veces consecutivas. Al final se vuelve a lavar con 5 x SSC durante 5 minutos.

Una vez acabados los lavados se saca la membrana y se une a las soluciones de detección durante 1 minuto a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se elimina las soluciones de detección y se coloca en oscuridad una película autorradiográfica encima de la membrana durante 30 minutos. A continuación se revela la membrana para observar las diferentes bandas de hibridación.

El tamaño molecular de las bandas de hibridación fueron determinadas por la comparación con marcadores conocidos. La intensidad de la banda de la hibridación con

pmrA fue determinada por análisis computerizado utilizando el programa Whole-Band Analyzer, Bioimage.

IV. Resultados

1. Determinación de la sensibilidad de gemifloxacino y

trovafloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae*.

Definimos la CMI como la concentración más baja de antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de forma visible a las 20-24 horas de incubación a 35°C. Las 73 cepas utilizadas en este estudio fueron clasificadas en diferentes grupos de acuerdo a la CMI de ciprofloxacino: CMI= 2 µg/ml, CMI= 4 µg/ml, CMI= 8 µg/ml y CMI ≥16 µg/ml. La comparación de las CMI de trovafloxacino frente a gemifloxacino (clasificadas por la CMI a ciprofloxacino) fue realizada usando el test no paramétrico de la U-Mann-Whitney.

El rango y la CMI₉₀ de gemifloxacino y trovafloxacino en grupos de cepas clasificados por la CMI de ciprofloxacino se muestra en la tabla 2. Se encontró que gemifloxacino presenta una mejor actividad que trovafloxacino, estadísticamente significativa (p<0,001) frente *S. pneumoniae*, independientemente de la CMI de ciprofloxacino. Utilizando el punto de corte provisional sugerido por la British Society of Antimicrobial Agents (BSAC) para cepas resistentes a gemifloxacino (≥ 0,5 µg/ml) (156), todas las cepas estudiadas fueron sensibles a dicho antimicrobiano. Este punto de corte viene de la siguiente fórmula:

$$\text{Punto de corte} = (\text{Cmax} \cdot f / t \cdot e) \times S$$

donde,

Cmax es el pico de concentración en sangre de fármaco microbiológicamente activo =

1,1 µg/ml

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

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

e es el número de veces que la Cmax debe exceder la CMI (Índice de Neu = **4**)

El resultado de la operación se redondea al valor más cercano en la serie de diluciones dobles. El resultado sale 0,55 por lo que redondeando se obtiene 0,5.

Tabla 2. Rango y CMI₉₀ de gemifloxacino y trovafloxacino en grupos de cepas clasificados por la CMI de ciprofloxacino.

Grupos de cepas por la CMI de ciprofloxacino	Trovafloxacino		Gemifloxacino	
	Rango (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
CMI = 2 µg/ml (n=30)	0,03-0,12	0,12	0,007-0,03	0,03
CMI = 4 µg/ml (n=28)	0,03-4	1	0,007-0,12	0,06
CMI = 8 µg/ml (n=7)	0,06-0,5	0,5	0,015-0,06	0,06
CMI ≥ 16 µg/ml (n=8)	1-4	4	0,06-0,25	0,25

En cambio para trovafloxacino 9 de las 73 cepas (12.3%) estudiadas presentaron sensibilidad disminuida o resistencia intermedia a trovafloxacino (CMI ≥ 2 µg/ml) mientras que 4 de las 73 cepas (5.5%) fueron plenamente resistentes a trovafloxacino (CMI ≥ 4 µg/ml) (tabla 2). Se observó que existe una correlación significativa entre las CMI de trovafloxacino y de gemifloxacino y la CMI de ciprofloxacino, ya que a medida que aumenta la CMI a ciprofloxacino aumenta la CMI₉₀ a las dos nuevas quinolonas.

Por otro lado, las cepas fueron clasificadas en tres grupos respecto a su sensibilidad a

penicilina (sensible, intermedia, resistente). No se observó correlación con la CMI a penicilina para ninguna de las tres quinolonas ya que indistintamente del nivel de sensibilidad a penicilina las cepas presentaron la misma CMI₉₀ a las tres quinolonas estudiadas (tabla 3).

Tabla 3. Rango y CMI₉₀ de ciprofloxacino, gemifloxacino y trovafloxacino en grupos de cepas clasificados por el nivel de sensibilidad a penicilina.

	Sensible a penicilina		Intermedia a penicilina		Resistente a penicilina	
	Rango ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Ciprofloxacino	2-16	2	2-16	4	2-8	4
Trovafloxacino	0.03-2	0.12	0.06-4	0.12	0.03-0.5	0.06
Gemifloxacino	0.007-0.25	0.015	0.015-0.25	0.015	0.015-0.12	0.015

2. Determinación de la actividad bactericida sérica después de una dosis oral de gemifloxacino (320 mg) y una dosis oral de trovafloxacino (200 mg).

2.1. Elección de cepas y sensibilidad

Las cepas escogidas para la realización del ensayo clínico presentaron las siguientes características (tabla 4): una cepa con serotipo 3 sensible a penicilina y a ciprofloxacino y otra con serotipo 9 resistente a penicilina y a ciprofloxacino. Las CMI para la cepa con serotipo 3 fueron 0,03 y 1 $\mu\text{g/ml}$ para penicilina y ciprofloxacino respectivamente, y para la cepa con

serotipo 9 fueron 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ para penicilina y ciprofloxacino respectivamente. Mientras que para los antimicrobianos ensayados, las modas de la CMI y CMB ($\mu\text{g/ml}$) para la cepa con serotipo 3 para gemifloxacino fueron 0,015 y 0,03, respectivamente y para trovafloxacino 0,06 y 0,12, respectivamente. Para la cepa con serotipo 9 las modas de la CMI y CMB ($\mu\text{g/ml}$) para gemifloxacino fueron 0,03 y 0,06, respectivamente y para trovafloxacino 0,25 y 0,5, respectivamente.

Tabla 4. CMI ($\mu\text{g/ml}$) de las cepas utilizadas en el ensayo.

Cepas	Penicilina	Ciprofloxacino	Gemifloxacino	Trovafloxacino
Serotipo 3	0,03	1	0,015	0,06
Serotipo 9	2	4	0,03	0,25

En la tabla 4b se observa que las CMI y CMB cuando son realizadas con suero son similares para gemifloxacino excepto la CMB de la cepa con serotipo 9 en la que aumentó una dilución, mientras que para trovafloxacino aumentó al menos dos diluciones cuando las CMI se realizaron con suero.

Tabla 4b. Efecto del suero en la CMI y CMB ($\mu\text{g/ml}$) de las cepas utilizadas en el ensayo.

Cepa	Ensayo	Gemifloxacino		Trovafloxacino	
		CMI	CMB	CMI	CMB
Serotipo 3	Con suero	0,015	0,03	0,25	1
	Sin suero	0,015	0,03	0,06	0,12
Serotipo 9	Con suero	0,03	0,12	1	>1
	Sin suero	0,03	0,06	0,25	0,5

2.2. Determinación de las concentraciones séricas por método

microbiológico (bioensayo) y plasmáticas por HPLC de gemifloxacino y trovafloxacino

Las concentraciones de gemifloxacino y trovafloxacino determinadas por HPLC y bioensayo se muestran en la tabla 5 y 6 y en las figuras 10 y 11:

Tabla 5. Concentraciones séricas de gemifloxacino obtenidas en plasma por HPLC y suero por bioensayo ($\mu\text{g/ml}$; media \pm DS).

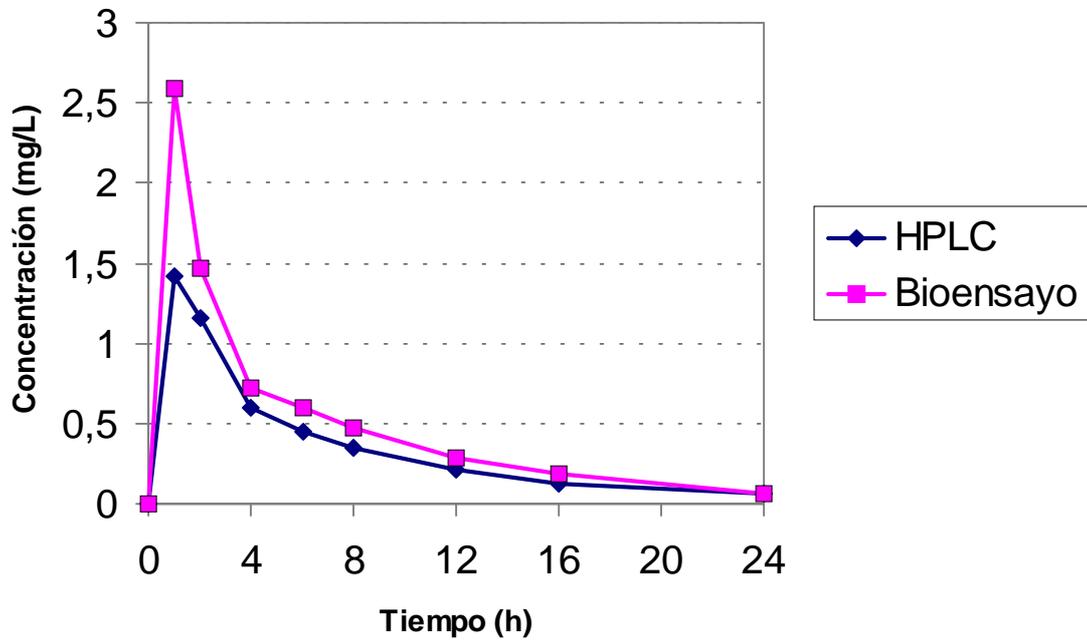
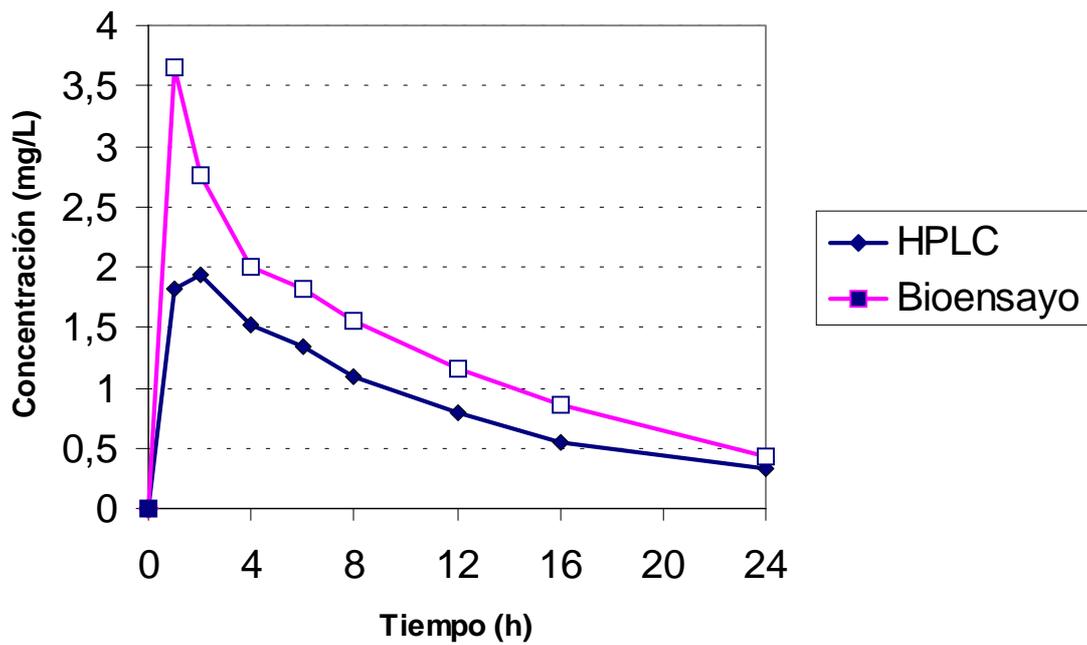
Tiempo toma de muestra (h)	Gemifloxacino			
	HPLC		Bioensayo	
	Nº de muestras ¹	Media \pm DS	Nº de muestras ¹	Media \pm DS
0	0		0	
1	12	1.42 \pm 0.58	12	2.59 \pm 1.17
2	12	1.16 \pm 0.21	12	1.47 \pm 0.48
4	12	0.60 \pm 0.10	12	0.72 \pm 0.16
6	12	0.45 \pm 0.09	12	0.60 \pm 0.16
8	12	0.35 \pm 0.07	12	0.47 \pm 0.20
12	12	0.21 \pm 0.05	12	0.29 \pm 0.10
16	12	0.12 \pm 0.03	12	0.19 \pm 0.08
24	12	0.06 \pm 0.02	12	0.06 \pm 0.03
36	11	0.02 \pm 0.00	2	0.06 \pm 0.00
48	3	0.01 \pm 0.00	0	
72	0		0	

¹ Nº de muestras con concentraciones de gemifloxacino por encima del límite de detección (bioensayo: 0.02 $\mu\text{g/ml}$ y HPLC: 0.01 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla 6. Concentraciones séricas de trovafloxacino obtenidas en plasma por HPLC y suero por bioensayo ($\mu\text{g/ml}$; media \pm DS).

Tiempo toma de muestra (h)	Trovafloxacino			
	HPLC		Bioensayo	
	Nº de muestras ¹	Media \pm DS	Nº de muestras ¹	Media \pm DS
0	0		0	
1	12	1.92 \pm 0.74	12	3.65 \pm 1.03
2	12	1.93 \pm 0.42	12	2.76 \pm 0.75
4	12	1.52 \pm 0.32	12	2.00 \pm 0.62
6	12	1.34 \pm 0.28	12	1.82 \pm 0.42
8	12	1.09 \pm 0.24	12	1.55 \pm 0.41
12	12	0.79 \pm 0.18	12	1.15 \pm 0.28
16	12	0.54 \pm 0.13	12	0.86 \pm 0.24
24	12	0.33 \pm 0.10	12	0.43 \pm 0.16
36	11	0.15 \pm 0.05	2	0.22 \pm 0.11
48	3	0.08 \pm 0.02	0	0.13 \pm 0.08
72	0	0.03 \pm 0.00	0	

¹ Nº de muestras con concentraciones de trovafloxacino por encima del límite de detección (bioensayo: 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y HPLC: 0.025 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 10. Concentraciones de gemifloxacino por HPLC y bioensayo**Figura 11.** Concentraciones de trovafloxacino por HPLC y bioensayo

Correlación entre el HPLC y el bioensayo: la relación entre las concentraciones determinadas por bioensayo y por HPLC para ambos antimicrobianos fue determinada por una regresión de 2º orden polinómica (figura 12 y 13).

Figura 12. Correlación entre los dos métodos utilizados para gemifloxacino

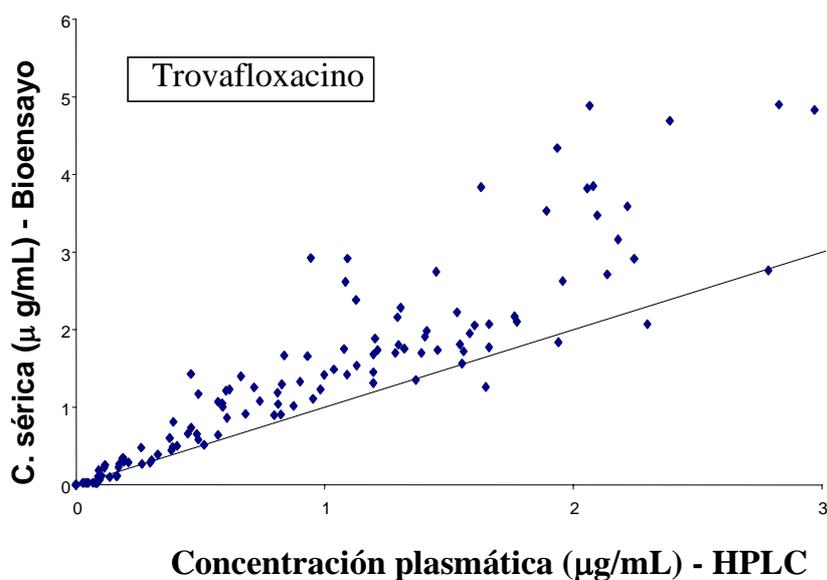
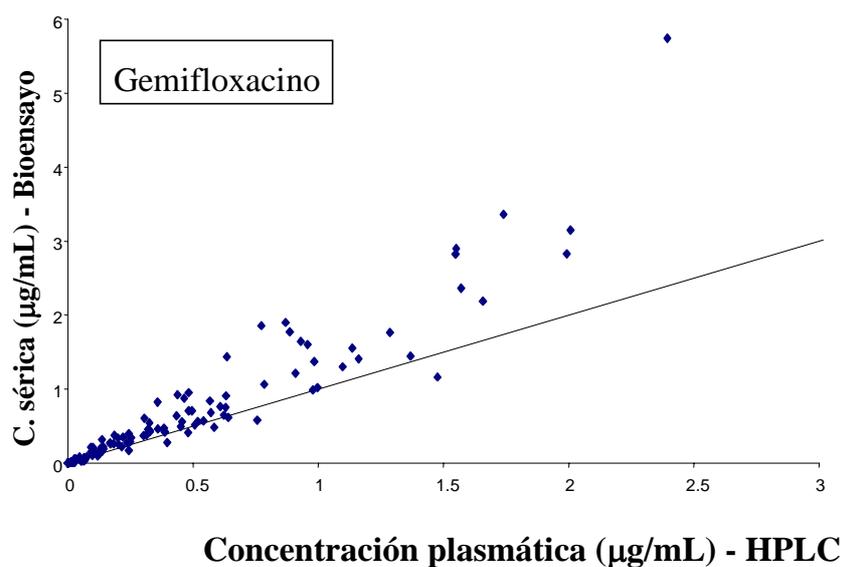


Figura 13. Correlación entre los dos métodos utilizados para trovafloxacino.

Las concentraciones de gemifloxacino y trovafloxacino determinadas por HPLC y por ensayo microbiológico correlacionaron bien ($r^2 = 0.85$ y $r^2 = 0.84$ para gemifloxacino y trovafloxacino, respectivamente), pero los niveles determinados por bioensayo fueron más altos que los medidos por HPLC principalmente en la primeras muestras para trovafloxacino y gemifloxacino (tabla 5 y 6).

Por otro lado las concentraciones alcanzadas por trovafloxacino fueron superiores a las alcanzadas por gemifloxacino para los dos métodos estudiados. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles determinados por bioensayo y HPLC entre gemifloxacino y trovafloxacino sobre las primeras 24 h de muestreo.

2.3. Determinación de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos

Una vez determinadas las concentraciones se realizó un análisis farmacocinético para determinar los diferentes parámetros farmacocinéticos. Las concentraciones en plasma a lo largo del tiempo de gemifloxacino y trovafloxacino fueron analizadas por métodos no compartimentales utilizando el programa WinNonlin Professional versión 1.5. Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos (unidades) para ambas quinolonas:

- C_{max} (concentración máxima alcanzada en plasma) ($\mu\text{g/ml}$)
- T_{max} (tiempo en alcanzar la C_{max}) (h)
- $t_{1/2}$ (vida media de eliminación) (h)
- AUC_{0-24h} (área bajo la curva) ($\mu\text{g.h/ml}$)

Los valores de estas parámetros han sido establecidos realizando la media de los 12 voluntarios (tabla 7). Todos los cálculos fueron basados en los tiempos de muestreo recogidos

a lo largo del estudio. Se calculó la constante de eliminación aparente (λ_z) utilizando un análisis de regresión lineal. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) fue calculada como $\ln 2/\lambda_z$. El área bajo la curva de las concentraciones en plasma entre el tiempo 0 y las 24 h (intervalo de dosis) fue calculada para ambos antimicrobianos utilizando un área trapezoidal lineal hasta la C_{max} y un área logarítmica trapezoidal para el resto de la curva (157). Los parámetros farmacocinéticos de gemifloxacino y trovafloxacino están basados en las concentraciones totales obtenidas en el estudio.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos (media \pm DS) de gemifloxacino y trovafloxacino basados en los datos obtenidos en el HPLC y el bioensayo.

Parámetros	Gemifloxacino		Trovafloracino	
	HPLC	Bioensayo	HPLC	Bioensayo
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	1.57 ± 0.43	2.62 ± 1.15	2.15 ± 0.44	3.75 ± 0.84
T_{max} (h)*	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)
$t_{1/2}$ (h)	7.80 ± 0.99	5.41 ± 1.61	10.7 ± 1.5	10.07 ± 3.10
AUC_{0-24h} ($\mu\text{g h/ml}$)	7.99 ± 1.59	11.03 ± 3.26	21.39 ± 4.42	31.12 ± 5.65

* mediana (rango)

Los parámetros farmacodinámicos muestran la relación entre la sensibilidad in vitro y la farmacocinética. Debido a que las quinolonas son concentración dependiente (157) se calcularon los siguientes parámetros farmacodinámicos para las dos cepas estudiadas:

- Cociente inhibitorio = C_{max}/CMI

- AUC_{0-24h}/CMI

En la tabla 8 se muestran los parámetros farmacodinámicos calculados para gemifloxacino y trovafloxacino frente a ambas cepas de *S. pneumoniae*. Los parámetros farmacodinámicos de gemifloxacino y trovafloxacino están basados en las concentraciones de fármaco libre obtenidas en el estudio, teniendo en cuenta el porcentaje de unión a proteínas (gemifloxacino 69% y trovafloxacino 76%).

Tabla 8. Parámetros farmacodinámicos (media \pm DS) de gemifloxacino y trovafloxacino basados en los datos obtenidos en el HPLC y el bioensayo.

Parámetros	Gemifloxacino		Trovafloracino	
	HPLC	Bioensayo	HPLC	Bioensayo
Cmax/ CMI Serotipo 3	104.37 \pm 28.75	174.8 \pm 76.4	35.90 \pm 7.33	62.44 \pm 13.97
Cmax/ CMI Serotipo 9	52.18 \pm 14.38	87.4 \pm 38.2	8.61 \pm 1.76	14.98 \pm 3.35
AUC_{0-24}/CMI Serotipo 3	532.99 \pm 105.9	735.65 \pm 217.5	356.47 \pm 73.6	518.62 \pm 94.1
AUC_{0-24}/CMI Serotipo 9	266.5 \pm 52.9	367.83 \pm 108.7	85.55 \pm 17.7	124.47 \pm 22.6

2.4. Determinación de los títulos bactericidas séricos

Además de la determinación de los títulos bactericidas séricos (TBS) experimentales se calcularon los títulos predictores utilizando los niveles determinados en la HPLC y en el bioensayo por el método descrito por Drusano y cols (159) y se representaron por la expresión $1/2^n$, donde n es el número de diluciones dobles que los niveles alcanzados en suero por el antimicrobiano están por encima del valor de la CMB. Los TBS fueron expresados como el inverso, así un TBS = $1/2$ se expresa como 2. Se consideró que el último TBS que se puede detectar para ser calculado fue un TBS=2, por lo tanto todos los TBS<2 calculados fueron descartados.

Tanto las áreas bajo la curva de los títulos bactericidas (AUBC) experimentales como las predictoras fueron calculadas a partir de una gráfica de los títulos bactericidas experimentales y predictores frente al tiempo. El AUBC predictora fue calculada como el área bajo la curva del tiempo cero al tiempo en el que el último título bactericida fue detectado (AUBC_{0-último}) haciendo las medias de la regla trapezoidal. Todos los cálculos fueron realizados con WinNonline Professional.

Los TBS experimentales y predictores (calculados con los datos obtenidos por HPLC y bioensayo) para gemifloxacino y trovafloxacino están incluidos en las tablas 9-12. Los TBS presentados en las tablas vienen expresados como la mediana de los 12 voluntarios.

Ninguna de las muestras predosis de las dos quinolonas mostró actividad bactericida frente a ambas cepas (TBS < 2). Respecto a los TBS predictores calculados con los datos del HPLC y el bioensayo solo se encontraron diferencias significativas para ambos antimicrobianos a las 1 h y 12 h. Por el contrario se encontraron diferencias significativas para ambos antimicrobianos cuando se comparó los TBS predictores obtenidos en el bioensayo y los TBS experimentales en todos los tiempos de las muestras con ambos antimicrobianos y

ambas cepas desde 0 a 24 h, excepto en 3 tiempos de las muestras con gemifloxacino frente el serotipo 3.

Con respecto a los TBS experimentales, se encontró que los TBS para gemifloxacino fueron significativamente más altos que para trovafloxacino para ambas cepas. Mientras que trovafloxacino no presentó actividad bactericida en cualquiera de las muestras de suero después de las 8 horas de las dosis, gemifloxacino mostró actividad bactericida en las muestras de suero hasta las 24 horas postdosis para la cepa sensible (serotipo 3) y hasta las 8 horas postdosis para las cepa resistente (serotipo 9). No se encontraron diferencias cuando se comparó la actividad bactericida a lo largo del tiempo de gemifloxacino frente a la cepa con serotipo 9 y cuando se comparó trovafloxacino frente a la cepa con serotipo 3. En el Tmax para ambas quinolonas (1 hora), gemifloxacino presentó unos TBS 4 veces superiores a los obtenidos por trovafloxacino para ambas cepas.

La mayor actividad bactericida de gemifloxacino fue demostrada por el área bajo la curva de los títulos bactericidas (AUBC), donde gemifloxacino presentó una AUBC 8 veces mayor que la de trovafloxacino frente ambas cepas de *S. pneumoniae*. Los valores de las AUBC de gemifloxacino y trovafloxacino para ambas cepas figuran en las tablas 13 y 14.

La comparación de los TBS fue realizada por análisis de la varianza con dos factores (tratamiento y fase de ensayo) con medidas repetidas. Los resultados fueron confirmados con un análisis no paramétrico (test de Wilcoxon y Mann-Whitney). Una $p < 0.01$ fue considerada como significación estadística.

Tabla 9. Títulos bactericidas séricos (TBS) experimentales y predictores (con los niveles obtenidos con HPLC y bioensayo) de gemifloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* con serotipo 3. Los datos viene expresados como mediana (rango).

Gemifloxacino-Serotipo 3			
Tiempo de muestra (h)	Experimentales	Predictores	
		HPLC	Bioensayo
0	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
1	32 (16 - 64)	32 (16 - 64)	64 (32 - 128)
2	16 (8 - 32)	32 (16 - 32)	32 (16 - 64)
4	12 (8 - 16)	16 (8 - 16)	16 (8 - 32)
6	8 (4 - 16)	8 (8 - 16)	16 (8 - 16)
8	16 (2 - 8)	8 (4 - 8)	8 (8 - 16)
12	4 (2 - 4)	4 (4 - 8)	8 (4 - 16)
16	2 (<2 - 4)	4 (2 - 4)	4 (2 - 8)
24	1 (<2 - 2)	<2 (<2 - 2)	<2 (<2 - 4)
36	<2 (<2 - 2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
48	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
72	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)

Los TBS vienen expresados por el inverso (Ej.: TBS= 1/2 = 2)

Tabla 10. Títulos bactericidas séricos (TBS) experimentales y predictores (con los niveles obtenidos con HPLC y bioensayo) de gemifloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* con serotipo 9. Los datos viene expresados como mediana (rango).

Gemifloxacino-Serotipo 9			
Tiempo de muestra (h)	Experimentales	Predictores	
		HPLC	Bioensayo
0	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
1	8 (4 - 16)	16 (8 - 32)	32 (16 - 64)
2	4 (2 - 8)	16 (8 - 16)	16 (8 - 32)
4	4 (<2 - 8)	8 (4 - 8)	8 (4 - 16)
6	2 (<2 - 8)	4 (4 - 8)	8 (4 - 8)
8	2 (<2 - 4)	4 (2 - 4)	4 (4 - 8)
12	<2 (<2 - 4)	2 (2 - 4)	4 (2 - 8)
16	<2 (<2 - 2)	2 (<2 - 2)	2 (<2 - 4)
24	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - 2)
36	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
48	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
72	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)

Los TBS vienen expresados por el inverso (Ej.: TBS= 1/2 = 2)

Tabla 11. Títulos bactericidas séricos (TBS) experimentales y predictores (con los niveles obtenidos con HPLC y bioensayo) de trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* con

serotipo 3. Los datos viene expresados como mediana (rango).

Trovafloxacino-Serotipo 3			
Tiempo de muestra (h)	Experimentales	Predictores	
		HPLC	Bioensayo
0	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
1	8 (2 - 8)	16 (2 - 16)	16 (8 - 32)
2	4 (2 - 4)	8 (<2 - 16)	16 (16 - 16)
4	2 (<2 - 4)	8 (4 - 16)	8 (8 - 16)
6	2 (<2 - 2)	8 (4 - 8)	8 (8 - 16)
8	<2 (<2 - <2)	8 (4 - 8)	8 (8 - 8)
12	<2 (<2 - <2)	4 (2 - 8)	8 (4 - 8)
16	<2 (<2 - <2)	4 (2 - 4)	4 (2 - 8)
24	<2 (<2 - <2)	2 (<2 - 4)	2 (2 - 4)
36	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - 2)
48	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
72	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)

Los TBS vienen expresados por el inverso (Ej.: TBS= 1/2 = 2)

Tabla 12. Títulos bactericidas séricos (TBS) experimentales y predictores (con los niveles obtenidos con HPLC y bioensayo) de trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* con serotipo 9. Los datos viene expresados como mediana (rango).

Trovafloxacino-Serotipo 9			
Tiempo de muestra (h)	Experimentales	Predictores	
		HPLC	Bioensayo
0	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
1	2 (2 - 4)	4 (<2 - 4)	4 (2 - 8)
2	<2 (<2 - 4)	2 (<2 - 4)	4 (4 - 4)
4	<2 (<2 - 2)	2 (<2 - 4)	2 (2 - 4)
6	<2 (<2 - 2)	2 (<2 - 2)	2 (2 - 4)
8	<2 (<2 - 2)	2 (<2 - 2)	2 (2 - 2)
12	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - 2)	2 (<2 - 2)
16	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - 2)
24	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
36	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
48	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)
72	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)	<2 (<2 - <2)

Los TBS vienen expresados por el inverso (Ej.: TBS= 1/2 = 2)

Tabla 13. Area bajo la curva de los títulos bactericidas (AUBC) experimental y predictora (con los niveles obtenidos con HPLC y bioensayo) de gemifloxacino frente a ambas cepas de *S. pneumoniae*.

Cepa	Experimentales	Predictoras	
		HPLC	Bioensayo
Serotipo 3	168 (66 - 260)	165 (102 - 258)	216 (177 - 483)
Serotipo 9	30 (7 - 100)	72 (45 - 117)	102 (83 - 242)

Tabla 14. Area bajo la curva de los títulos bactericidas (AUBC) experimental y predictoras (con los niveles obtenidos con HPLC y bioensayo) de trovafloxacino frente a ambas cepas de *S. pneumoniae*.

Cepa	Experimentales	Predictora	
		HPLC	Bioensayo
Serotipo 3	22 (5 - 32)	120 (59 - 182)	191 (130 - 250)
Serotipo 9	2 (2 - 24)	16 (3 - 32)	36 (20 - 51)

2.5. Determinación de la tasa de muerte ex vivo de *S. pneumoniae*, en sueros de voluntarios (en presencia y ausencia de leucocitos polimorfonucleares) tratados con gemifloxacino y trovafloxacino.

Las curvas de letalidad de *S. pneumoniae* sensible a penicilina y ciprofloxacino (serotipo 3) y resistente a penicilina y ciprofloxacino (serotipo 9) en presencia de suero, PMN y suero + PMN a los -14 días (basal), 1 y 24 horas están representadas en las figuras 14-19. Los valores de estas curvas han sido establecidos realizando la media de los 12 voluntarios.

La reducción del inóculo inicial (RII) a los 3 horas del ensayo y para cada tiempo de muestra (basal, 1 y 24 horas) está recogido en la tabla 15 para la cepa con serotipo 3 y en la tabla 16 para la cepa con serotipo 9. Para comparar estadísticamente los diferentes curvas se realizó un análisis de la varianza con comparaciones múltiples (test de Scheffé).

Si comparamos las curvas a lo largo del tiempo de las diferentes muestras (basal, 1 y 24 horas) obtenemos que en general para todas las curvas estudiadas, para ambas cepas y ambos antimicrobianos, en el control y los PMN no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la reducción del Log_{10} de las UFC/ml entre la visita basal y las visitas postdosis (1 y 24 horas) a las 3 horas del ensayo (tabla 15 y 16).

Si nos detenemos en el tratamiento realizado con suero y suero + PMN, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la reducción del Log_{10} UFC/ml entre la visita basal y la muestra de 1 hora para ambas quinolonas, pero no encontramos diferencias significativas entre la visita basal y la muestra de 24 horas, salvo en el caso cepa sensible con gemifloxacino. Mientras que si comparamos lo que ocurre entre las visitas postdosis (1 y 24 horas), comprobamos que existen diferencias significativas entre las dos curvas (tabla 15 y 16) para ambos antimicrobianos.

Si comparamos la actividad de los antimicrobianos ensayados podemos observar en la tabla 15 y 16 que la reducción del inóculo inicial a la 1 hora (log_{10} UFC/ml) en las curvas que contenían suero y suero + PMN para ambas cepas de *S. pneumoniae*, tanto sensible como resistente, fue mayor para gemifloxacino que para trovafloxacino existiendo diferencias significativas. Mientras que sólo se observó una reducción del inóculo inicial a las 24 horas en las curvas de suero y suero + PMN cuando gemifloxacino fue enfrentado a la cepa sensible (serotipo 3), no observándose este efecto para trovafloxacino cuando fue enfrentado a la cepa

sensible ni para gemifloxacino ni trovafloxacino cuando fueron enfrentados a la cepa resistente (serotipo 9).

Para comprobar la actividad de los PMN, se comparó la reducción del inóculo inicial a las 3 horas (\log_{10} UFC/ml) entre las curvas de suero frente a suero + PMN. No se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la curva con suero y la de suero + PMN para ninguna de las dos cepas, ni para gemifloxacino ni trovafloxacino (tabla 15 y 16). Además en ninguna de las curvas de letalidad se observó una reducción del inóculo inicial cuando fueron ensayados los PMN por separado.

Tabla 15 . Reducción del inóculo inicial (\log_{10} UFC/ml \pm D.S.) de *S. pneumoniae* con serotipo 3 a las 3 horas del ensayo en los diferentes tiempos tomadas de voluntarios tras la administración de una dosis oral de 320 mg de gemifloxacino y 200 mg de trovafloxacino.

	Curva	Gemifloxacino	Trovafloxacino
Basal	Control	-0.83 ± 0.25	-0.83 ± 0.25
	PMN	-1.56 ± 0.36	-1.58 ± 0.16
	Suero	-1.62 ± 0.18	-1.61 ± 0.13
	Suero + PMN	-1.74 ± 0.14	-1.62 ± 0.16
1 h	Control	-0.71 ± 0.23	-0.71 ± 0.23
	PMN	-0.61 ± 0.10	-1.32 ± 0.39
	Suero	1.99 ± 0.2	1.50 ± 0.25
	Suero + PMN	2.01 ± 0.03	1.40 ± 0.27
24 h	Control	-0.85 ± 0.20	-0.85 ± 0.20
	PMN	-1.53 ± 0.11	-1.49 ± 0.09
	Suero	0.09 ± 0.16	-1.00 ± 0.03
	Suero + PMN	0.36 ± 0.10	-0.98 ± 0.01

Tabla 16. Reducción del inóculo inicial (\log_{10} UFC/ml \pm D.S.) de *S. pneumoniae* resistente a penicilina (serotipo 9) a las 3 horas del ensayo en las diferentes tiempos tomadas de voluntarios tras la administración de una dosis oral de 320 mg de gemifloxacino y 200 mg de trovafloxacino.

	Curva	Gemifloxacino	Trovafloxacino
Basal	Control	-0.71 ± 0.33	-0.71 ± 0.33
	PMN	-1.37 ± 0.15	-1.32 ± 0.12
	Suero	-1.67 ± 0.16	-1.51 ± 0.05
	Suero + PMN	-1.68 ± 0.13	-1.53 ± 0.08
1 h	Control	-0.82 ± 0.01	-0.82 ± 0.01
	PMN	-1.25 ± 0.12	-1.44 ± 0.07
	Suero	1.89 ± 0.2	0.99 ± 0.33
	Suero + PMN	1.92 ± 0.19	1.03 ± 0.29
24 h	Control	-0.88 ± 0.24	-0.88 ± 0.24
	PMN	-1.60 ± 0.01	-1.66 ± 0.04
	Suero	-0.53 ± 0.05	-1.00 ± 0.03
	Suero + PMN	-0.56 ± 0.01	-0.98 ± 0.01

Figura 14. Curvas de letalidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* serotipo 3 en la muestra basal.

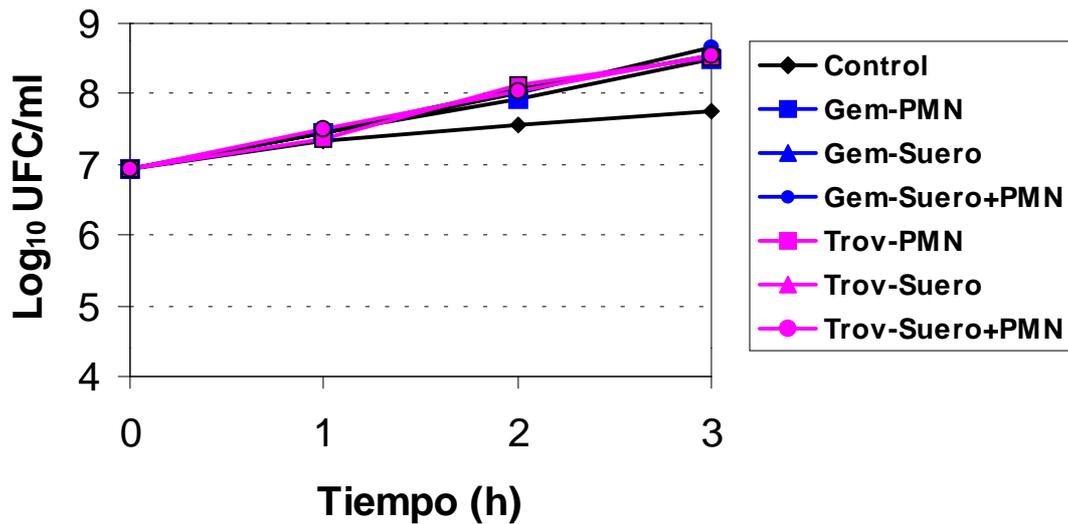


Figura 15. Curvas de letalidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* serotipo 9 en la muestra basal.

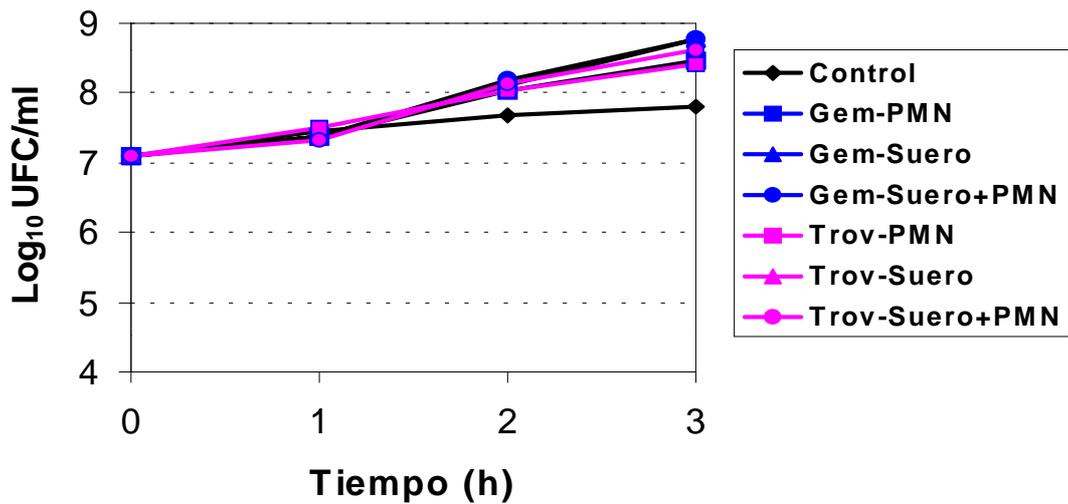


Figura 16. Curvas de letalidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* serotipo **3** en la muestra de **1 hora**.

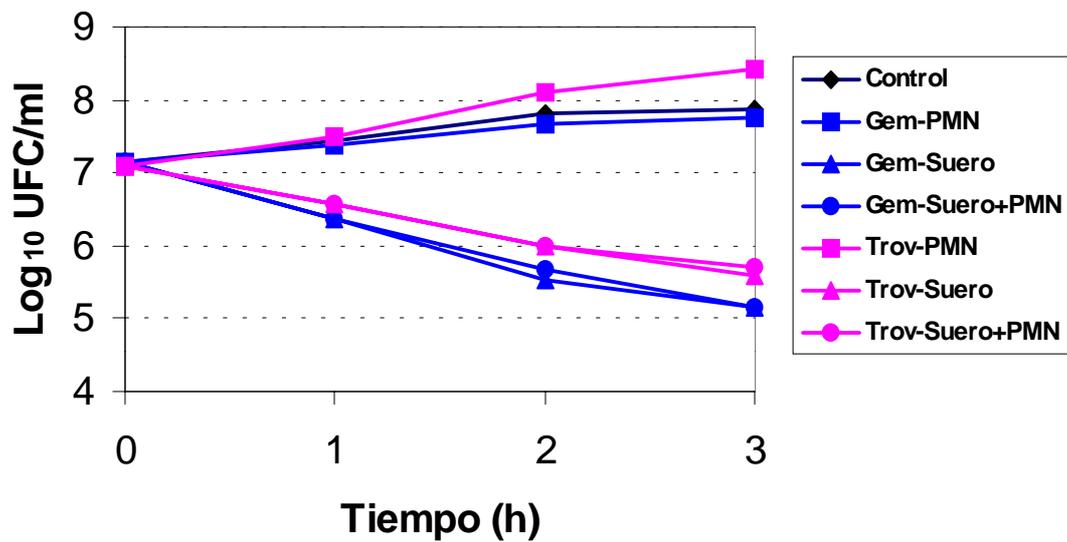


Figura 17. Curvas de letalidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* serotipo **9** en la muestra de **1 hora**.

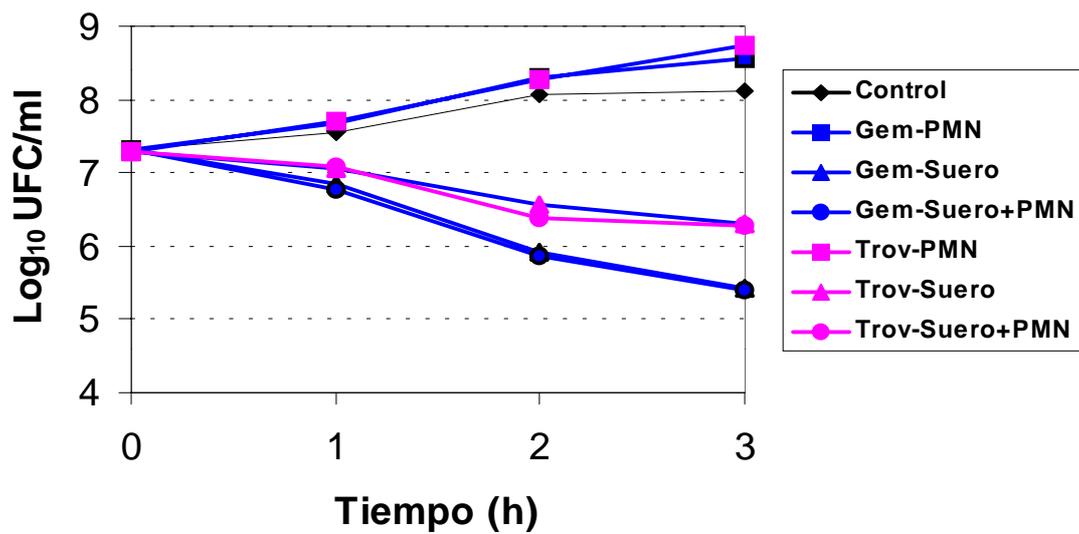


Figura 18. Curvas de letalidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* serotipo 3 en la muestra de 24 horas.

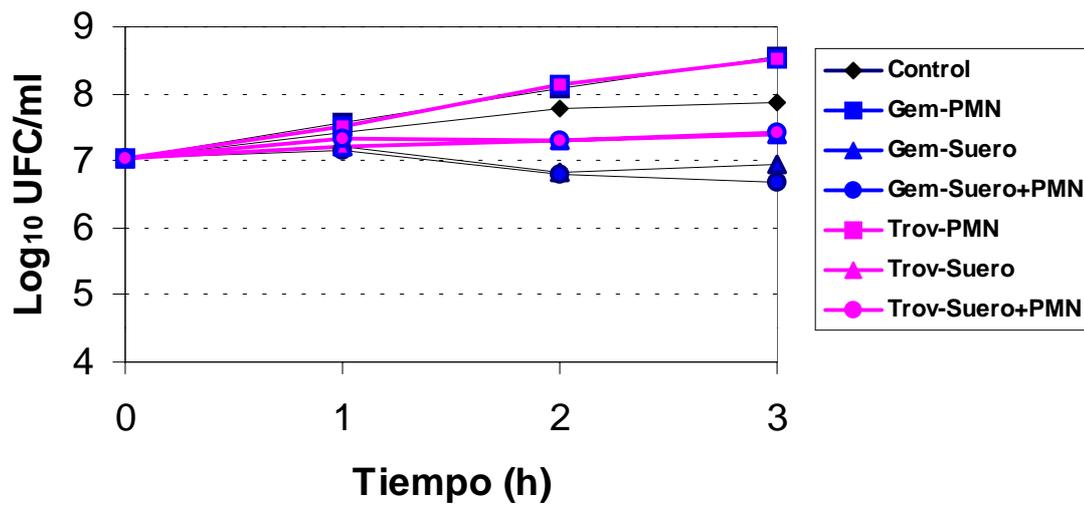
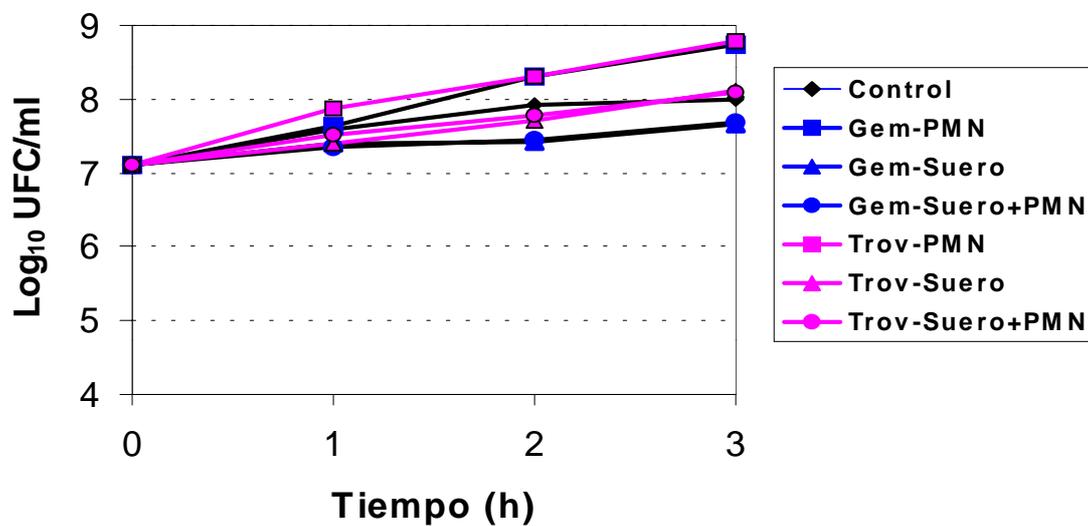


Figura 19. Curvas de letalidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* serotipo 9 en la muestra de 24 horas.



3. Determinación del efecto postantibiótico (EPA) de gemifloxacino y trovafloxacino con diferentes concentraciones (1, 4, 10 x CMI) frente a *S. pneumoniae*.

El efecto inducido *in vitro* sobre el crecimiento de *S. pneumoniae* cepa sensible (serotipo 3) y resistente (serotipo 9) a penicilina y ciprofloxacino tras una exposición de 1 hora a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI de los antimicrobianos ensayados se muestra en las figuras 20-23. En la tabla 17 y 18 aparecen los valores de EPA inducidos por cada antimicrobiano. Se considera un EPA significativo el superior a 30 minutos (149).

Tabla 17. Efecto postantibiótico (en horas) de gemifloxacino frente a *S. pneumoniae* sensible (serotipo3) y resistente (serotipo 9) a penicilina y ciprofloxacino.

GEMIFLOXACINO	1 x CMI	4 x CMI	10 x CMI
SEROTIPO 3	0.7	1.2	1.5
SEROTIPO 9	0.3	0.9	1.4

Tabla 18. Efecto postantibiótico (en horas) de trovafloxacino frente a *S. pneumoniae* sensible (serotipo3) y resistente (serotipo 9) a penicilina y ciprofloxacino.

TROVAFLOXACINO	1 x CMI	4 x CMI	10 x CMI
SEROTIPO 3	0.7	1.2	2.1
SEROTIPO 9	0.4	1.3	2.1

Se obtuvieron EPA significativos para todas las concentraciones de gemifloxacino y trovafloxacino y para las dos cepas estudiadas, salvo en la concentración 1x CMI de las dos quinolonas frente a la cepa resistente (serotipo 9).

Comparando los resultados obtenidos respecto a las cepas sensible y resistente, no se observaron diferencias significativas para trovafloxacino ni gemifloxacino en las concentraciones superiores (4 x CMI y 10 x CMI) indistintamente de la cepa estudiada. Por otro lado cuando se compararon trovafloxacino y gemifloxacino, se obtuvieron EPA similares para ambas quinolonas y para las dos cepas y en todas las concentraciones, salvo en la concentración de 10 x CMI de las cepas con serotipo 3 y con serotipo 9 donde trovafloxacino presentó un EPA ligeramente superior, 2.1 y 2.1 horas, respectivamente, a gemifloxacino que presentó un EPA de 1.5 y 1.4 horas, respectivamente.

Figura 20. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de gemifloxacino a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI frente la cepa con serotipo 3.

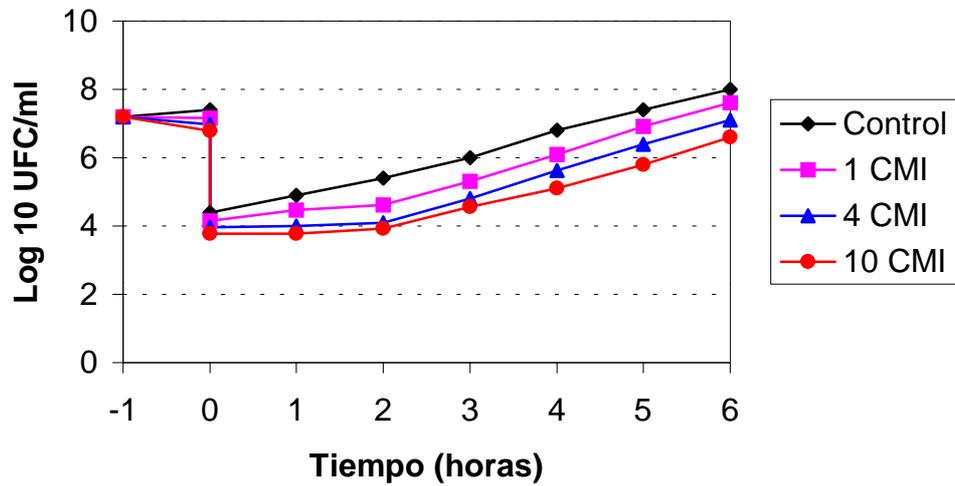


Figura 21. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de gemifloxacino a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI frente la cepa con serotipo 9.

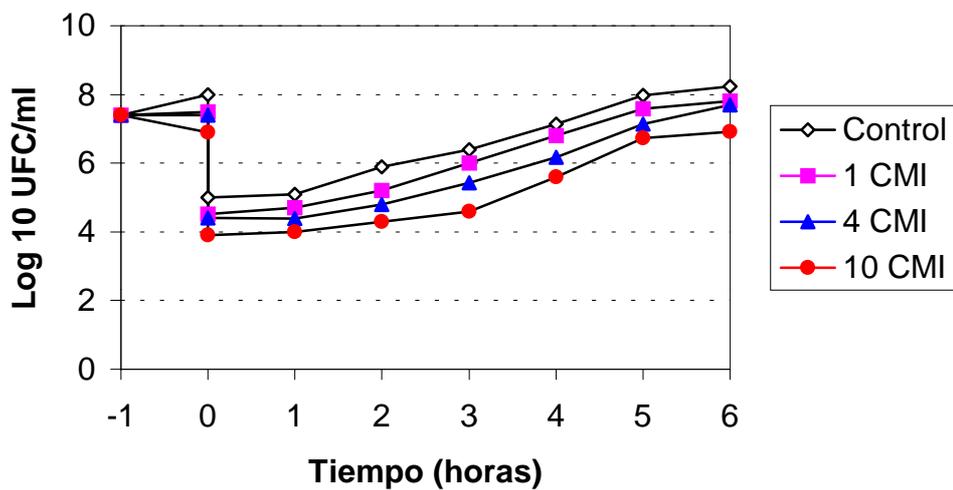


Figura 22. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de trovafloxacino a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI frente la cepa con serotipo 3.

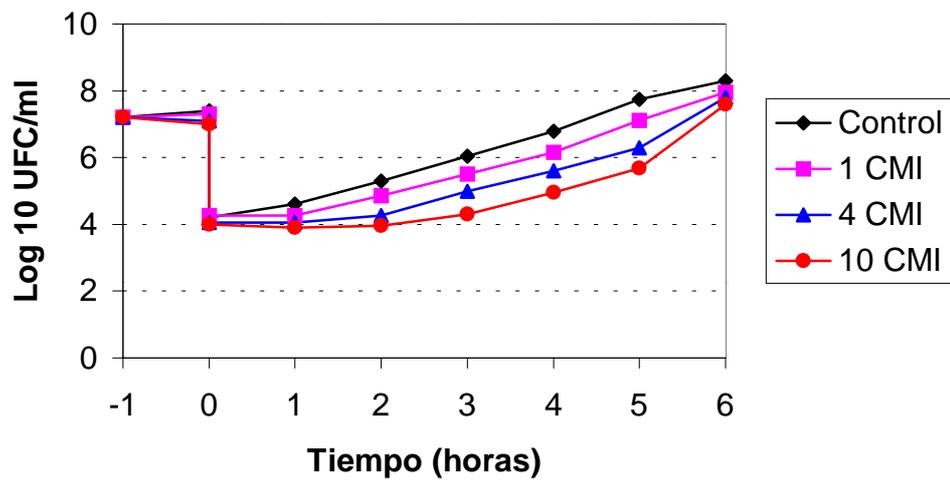
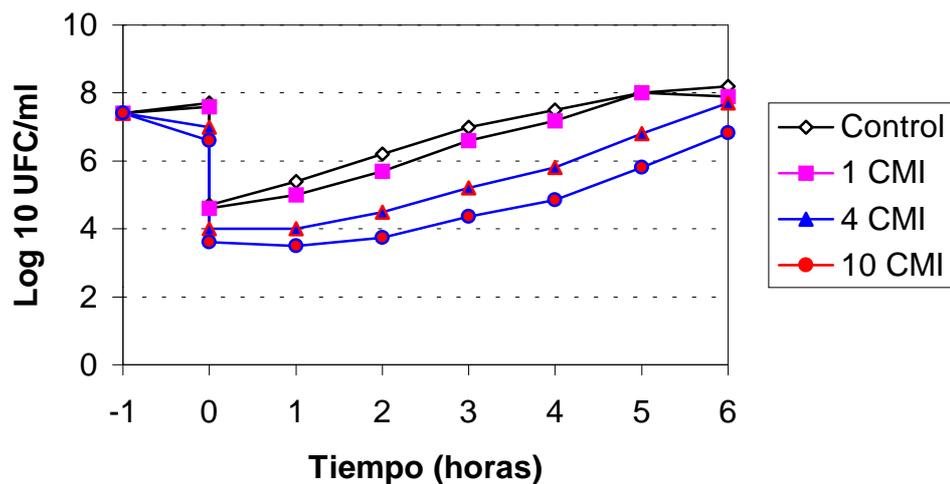


Figura 23. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de trovafloxacino a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI frente la cepa con serotipo 9.



4. Determinación de la influencia de suero en la sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae*.

Debido a los resultados obtenidos en las CMI realizadas con suero frente a gemifloxacino y trovafloxacino y los resultados obtenidos en los TBS se planteó realizar un estudio donde se valorase la influencia del suero en la actividad de las quinolonas frente a un número más significativos de aislados.

Así, definimos la CMI como la concentración más baja de antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de forma visible a las 20-24 horas de incubación a 35°C. Las 60 cepas utilizadas en este estudio fueron clasificadas en diferentes grupos de acuerdo a la CMI de ciprofloxacino: CMI= 0.5 µg/ml (14 cepas), CMI= 1 µg/ml (10 cepas), CMI= 2 µg/ml (8 cepas), CMI= 4 µg/ml (11 cepas) y CMI ≥8 µg/ml (17 cepas).

Los porcentajes de resistencia fueron calculados utilizando los puntos de corte establecidos por el NCCLS para trovafloxacino (144). Para ciprofloxacino se consideró a las cepas resistentes con una CMI ≥ 4 µg/ml (puntos de corte no disponibles en el NCCLS), mientras que para gemifloxacino se consideraron cepas resistentes a aquellas con una CMI ≥ 1 µg/ml, según la concentración máxima obtenidas en nuestro estudio (punto de corte no disponible en el NCCLS).

La CMI₉₀ y porcentaje de resistencia determinados en caldo (C) y suero (S) de ciprofloxacino, trovafloxacino y gemifloxacino en grupos de cepas clasificados por la CMI de ciprofloxacino se muestran en la tabla 19.

Para los resultados obtenidos con caldo, se encontró que gemifloxacino presenta una mejor actividad que trovafloxacino, estadísticamente significativa ($p < 0,001$) frente *S.*

pneumoniae, independientemente de la CMI de ciprofloxacino, confirmando el estudio realizado en el primer apartado. No se encontraron cepas resistentes a gemifloxacino para ninguno de los grupos con diferentes CMI a ciprofloxacino, mientras que para trovafloxacino aumento el porcentaje de cepas resistentes cuando la CMI a ciprofloxacino fue de 4 y ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$.

Respecto a la CMI realizadas con suero se observó un aumento de la CMI₉₀ para trovafloxacino y gemifloxacino respecto a la CMI₉₀ realizada en caldo indistintamente de la CMI a ciprofloxacino. Los porcentajes de resistencia obtenidos cuando las CMI fueron realizadas con suero fueron iguales a los obtenidos en caldo para gemifloxacino salvo para las cepas con CMI a ciprofloxacino ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ que aumentó hasta un 29% de cepas resistentes. El porcentaje de resistentes totales pasó de 0% cuando las CMI fueron realizadas con caldo hasta el 7% cuando fueron realizadas con suero.

En cambio para trovafloxacino, los porcentajes de resistencia obtenidos cuando las CMI fueron realizadas con suero aumentaron cuando la CMI a ciprofloxacino fue 4 y ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, de 18 a 46% y 65 a 82%, respectivamente. Los porcentajes de resistentes totales de trovafloxacino pasaron de 22% cuando las CMI fueron realizadas con caldo hasta el 38% cuando fueron realizadas con suero.

Por otro lado la influencia de suero en ciprofloxacino también fue patente ya que el porcentaje de resistentes totales pasó de 47% cuando las CMI fueron realizadas con caldo hasta el 63% cuando fueron realizadas con suero.

La comparación de las CMI de trovafloxacino frente a gemifloxacino (clasificadas por la CMI a ciprofloxacino) fue realizada usando el test no paramétrico de la U-Mann-Whitney, con un nivel de confianza de 95 %.

Tabla 17. CMI₉₀ y porcentaje de resistencia determinados en caldo (C) y suero (S) de ciprofloxacino, trovafloxacino y gemifloxacino en grupos de cepas clasificados por la CMI de ciprofloxacino.

Grupos de cepas por la CMI de ciprofloxacino	Ciprofloxacino		Trovafloxacino		Gemifloxacino	
	CMI ₉₀	% R	CMI ₉₀	% R	CMI ₉₀ C/S	% R
	C/S (µg/ml)	C/S	C/S (µg/ml)	C/S	(µg/ml)	C/S
CMI = 0.5 µg/ml (n=14)	0.5/2	0/9	0.125/1	0/0	0.03/0.125	0/0
CMI = 1 µg/ml (n=10)	1/4	0/30	0.125/0.5	0/10	0.03/0.25	0/0
CMI = 2 µg/ml (n=8)	2/4	0/75	0.125/0.5	0/0	0.03/0.125	0/0
CMI = 4 µg/ml (n=11)	4/16	100/100	2/4	18/46	0.25/0.5	0/0
CMI ≥ 8 µg/ml (n=17)	16/32	100/100	4/8	65/82	1/2	0/29
Total (n=60)	16/32	47/63	2/8	22/33	0.5/1	0/7

5. Estudio para la caracterización molecular de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino

La distribución de los aislados resistentes a ciprofloxacino de acuerdo a la susceptibilidad (CMI) fue de 62,1, 18,2, 15,8 y 3,6% para las CMI de 4, 8, 16 y >16 μ g/ml, respectivamente (tabla 20). Respecto a la distribución de los serogrupos de los aislados resistentes a ciprofloxacino, los más frecuentes fueron el serogrupo 19 (19.2%), 3 (13.2%), 9, 14 y 23 (12.0%), 6 (8.4%) y 18 (4.8%). Un 3.6% de las cepas fueron no tipables y el resto (14.8%) pertenecían a otros serogrupos (figura 24).

Tabla 20. Distribución de los 82 aislados resistentes a ciprofloxacino respecto al grado de resistencia a ciprofloxacino(CMI)

	CMI a ciprofloxacino (μ g/ml)			
	4	8	16	>16
Nº de cepas (%)	51 (62,1%)	15 (18,2%)	13 (15,8%)	3 (3,6%)

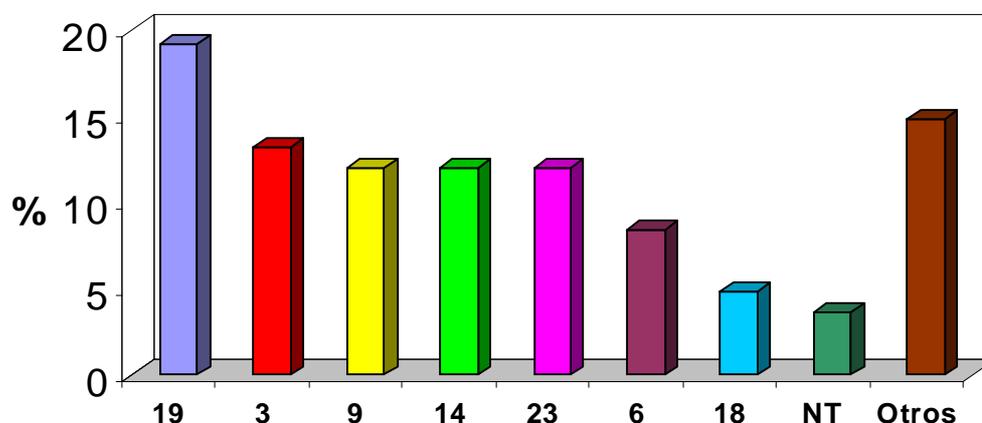


Figura 24. Distribución de los aislados resistentes a ciprofloxacino por su serogrupo.

Los perfiles obtenidos por la digestión con *SmaI* en el PFGE en el que al menos había dos aislados similares fueron asignados arbitrariamente con letras (A, B, C, etc), excepto para aquellos clones previamente reconocidos internacionalmente que siguieron la nueva nomenclatura recomendada. La tabla 21 resume los diferentes perfiles de PFGE incluyendo las variantes subtipos de los aislados de *S. pneumoniae* resistentes (en rojo en la tabla) y sensibles a ciprofloxacino.

Cada línea en la tabla representa aislados que tienen el mismo perfil de PFGE (mismo clon y mismo serogrupo) con la excepción de algunos aislados que representan patrones únicos que son clasificados por serogrupo (tabla 22). La mayoría de los clones identificados en este estudio fueron recogidos en más de un hospital y se observó que fueron identificados clones diferentes en todos los hospitales donde fue analizado más de un aislado. Aunque se encontraron tres excepciones de tres clones resistentes a ciprofloxacino (clones B, E y K), cada uno específico de tres hospitales diferentes.

Tabla 21. Diversidad de los perfiles microbiológicos de los aislados estudiados.

Ciprofloxacino ^a	Tipo PFGE	Serogrupo	Antibiotipo ^c (resistente a)	Nº total de cepas
Sensible	A	3		9
3-1-1-0	A	3	P(1), C(1), F(1)	5
1-0-0-0	B	3		1
1-0-0-0	B	19	P	1
1-0-2-0	C	6	P(2), E, C	3
2-0-0-0	D	8		2
2-0-0-0	E	14	P, C, F	2
Sensible	F	18		1
3-0-0-0	F	18		3
2-0-0-0	G	19	P(1), E(1), C	2
2-0-0-0	H	19	E	2
Sensible	I	19		1
0-1-0-0	I	19	E	1

Sensible	J	19	P(1), E, C	2
1-0-0-0	J	19	E	1
1-0-1-0	K	35	E	2
Sensible	L	ND ^d		1
Sensible	L	NT ^e		1
1-0-0-0	L	ND		1
Sensible	M	3		2
Sensible	N	6	C(1)	2
Sensible	O	9		2
Sensible	P	14	P, E(1), C, F(1)	2
Sensible	R	15	E(1)	2
Sensible	S	19	E(1)	2
Sensible	T	19	P, E, C	2
Sensible	V	11		2
Sensible	W	24		1
Sensible	W	NT	E, C(1)	2
Sensible	France ^{9V} -3	9	P, C	3
Sensible	France ^{9V} -3	14	P(3),C, F(1)	4
1-0-0-0	France9V-3	3		1
5-2-0-0	France9V-3	9	P(4), E(2), C, F(2)	7
1-2-0-0	France9V-3	14	P(2), E(1), C(2), F(1)	3
Sensible	Spain ¹⁴ -5	14	P, E, C	1
0-0-2-0	Spain14-5	14	P, E, C, F(1)	2
Sensible	Spain ^{23F} -1	19	P(3), E(3), C	4
Sensible	Spain ^{23F} -1	23	P(2), E(2), C, F(1)	4
4-1-1-1	Spain23F-1	19	P(5), E(4), C, F(3)	7
3-0-4-0	Spain23F-1	23	P(4), E(5), C(6), F(2)	7

^a Los aislados fueron clasificados con sensible si CMI =1µg/ml. Por otro lado, en la cepas CIP-R se presenta el número de aislados en cada grupo según la CMI a ciprofloxacino: 4-8-16->16µg/ml.

^b Los aislados que presentan el mismo clon por EFCEP pero expresan diferentes serogrupo vienen señalados en cursiva.

^c C=Cefaclor, E=Eritromicina, F=Cefotaxima y P=Penicilina. Entre paréntesis el número de aislados que eran resistentes, cuando no lo fueron todos.

^d No determinado

^e No tipable

Tabla 22. Diversidad de los perfiles microbiológicos de los aislados estudiados con clones únicos.

Ciprofloxacino ^a	Tipo PFGE	Serogrupo	Antibiotipo ^c (resistente a)	Nº total de cepas
Sensible	Único	6	E	3
Sensible	Único	9	P(2), E(1), C(2), F(1)	5
Sensible	Único	14	P(1), E(1), C(1), F(1)	2
Sensible	Único	18	C(1)	2
Sensible	Único	19	P(2), E(1), C(3), F(1)	5
Sensible	Único	23	P(2), E(1), C(2)	4
Sensible	Único	28		1
Sensible	Único	34		1
Sensible	Único	ND ^d		6
Sensible	Único	NT ^e	E(2), C(4)	9
3-1-0-0	Único	3	E(1), C(3)	4
1-0-0-0	Único	4		1
1-2-0-1	Único	6	P(1), E(3), C(2), F(1)	4
2-0-1-0	Único	9	E(1)	3
1-0-0-0	Único	11	E	1
0-1-1-1	Único	14	P(2), E(2), C(2), F(1)	3
1-0-0-0	Único	18		1
1-0-1-0	Único	19	E(1), C(2), F(1)	2
1-0-0-0	Único	22		1
3-0-0-0	Único	23	E(1), C(2)	3
1-0-0-0	Único	31		1
0-1-0-0	Único	35	P, C	1
1-0-0-0	Único	ND		1
1-2-0-0	Único	NT	P(2), E, C, F(1)	3

^a Los aislados fueron clasificados con sensible si CMI =1µg/ml. Por otro lado, en la cepas CIP-R se presenta el número de aislados en cada grupo según la CMI a ciprofloxacino: 4-8-16->16µg/ml.

^b Los aislados que presentan el mismo clon por EFCEP pero expresan diferentes serogrupo vienen señalados en cursiva.

^c C=Cefaclor, E=Eritromicina, F=Cefotaxima y P=Penicilina. Entre paréntesis el número de aislados que eran resistentes, cuando no lo fueron todos.

^d No determinado

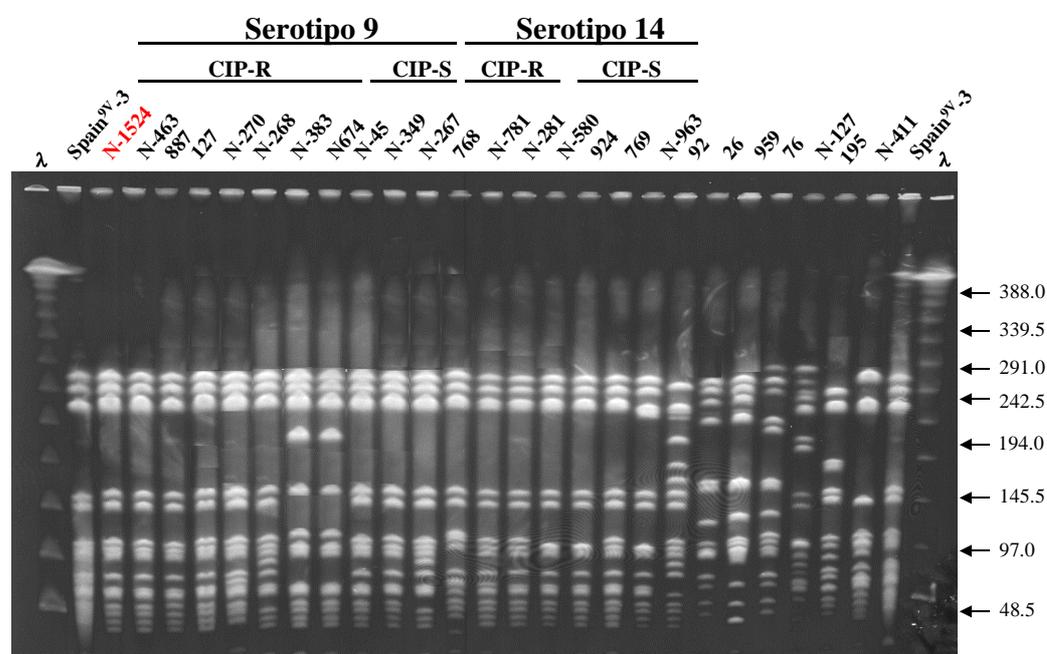
^e No tipable

Relación entre la CMI a ciprofloxacino y los tipos clonales:

La tabla 21 mostró que aislados que tienen el mismo perfil de PFGE y mismo serogrupo pueden ser resistentes a ciprofloxacino y sensibles a ciprofloxacino (clones A, F, I y J). Además, tres clones, con la excepción de los clones internacionalmente diseminados presentaron diferentes niveles de resistencia (clones A, C y K). Por otro parte, varios clones internacionalmente diseminados fueron identificados entre los aislados resistentes a ciprofloxacino y los sensibles a ciprofloxacino (tabla 21). La figura 25 y 26 muestra los miembros del clon internacional France^{9V}-3 y del Spain^{23F}-1 con diferentes grados de sensibilidad a ciprofloxacino. No es de sorprender que los aislados resistentes a ciprofloxacino con idéntico antibiotipo y serogrupo pertenecen a diferentes clones definidos por PFGE (ej., clones I y J) (tabla 21).

La tabla 23 muestra el número de clones diferentes encontrados entre los aislados resistentes y sensibles a ciprofloxacino. Por otro lado, al incrementarse la CMI a ciprofloxacino no se produce una reducción en la diversidad de los perfiles de PFGE. Así, se identificaron 32 patrones diferentes por PFGE entre los 51 aislados con CMI a ciprofloxacino de 4µg/ml; 12 entre los 15 aislados con CMI de 8µg/ml; 7 entre los 13 aislados con CMI de 16µg/ml y ninguno de los 3 aislados con MIC>16µg/ml tenía un perfil idéntico por PFGE (figura 27).

Figura 25. Miembros del clon France^{9V}-3 (serotipo 9 y 14) y clones únicos con serotipo 9 separado por PFGE previa digestión con *Sma*I



La CMI a ciprofloxacino ($\mu\text{g/ml}$) entre paréntesis de cada cepa: N-1524(4), N-463(4), 887(4), 127(4), N-270(8), N-268(4), N-383(8), N-674(4), N-45(1), N-349(1), N-267(1), 768(8), N-871(4), N-281(8), N-580(1), 924(1), 769(1), N-963(1), 92(4), 26(1), 959(1), 76(16), N-127(4), 195(1), N-411(1). CIP= ciprofloxacino, R= resistente, S= sensible. Las flechas indican el tamaño en kilobases

Figura 26. Miembros del clon Spain^{23F}-1 (serotipo 19 y 23) separado por PFGE previa digestión con *Sma*I.

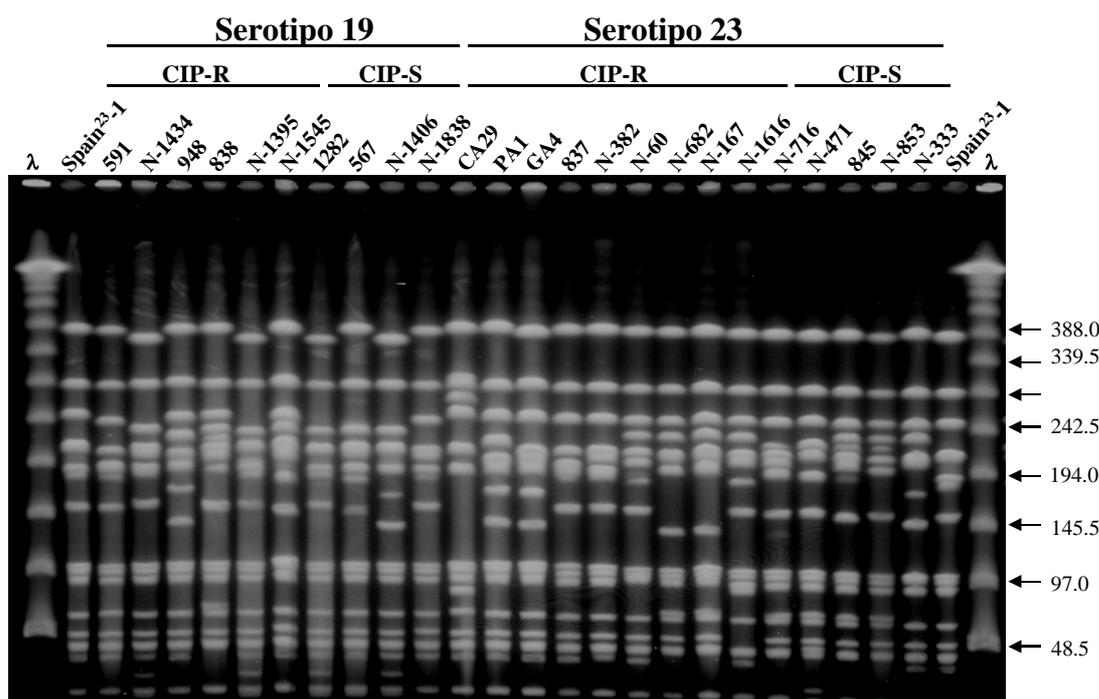
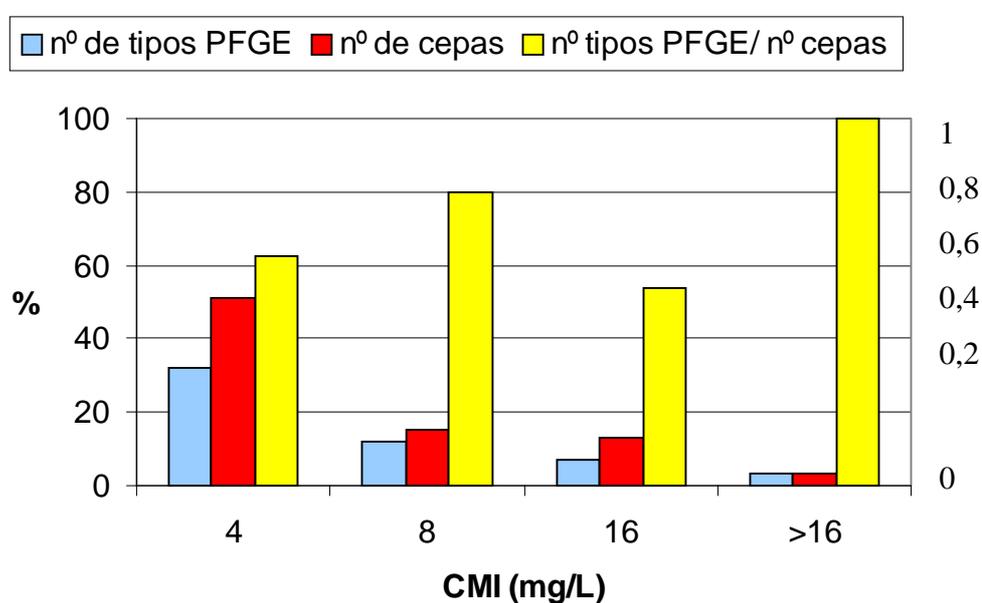


Tabla 23. Número de clones diferentes respecto a la sensibilidad a ciprofloxacino.

	Resistentes a ciprofloxacino	Sensibles a ciprofloxacino
Nº de cepas	82	90
Nº de clones diferentes	44	57

Figura 27. Número de tipos de PFGE respecto la CMI a ciprofloxacino.

En la tabla 24 se observan el número de cepas por cada tipo de patrón de PFGE y los clones únicos donde observamos el porcentaje de cada tipo de patrón de PFGE respecto al número de cepas resistentes a ciprofloxacino. Así, hay que destacar que aproximadamente un 30 % (en gris en la tabla 24) de los aislados resistentes a ciprofloxacino pertenecen a dos clones internacionales ampliamente extendidos (Spain^{23F}-1 y France^{9V}-3).

Tabla 24. Número de cepas por cada tipo de patrón de y el porcentaje de cada tipo de patrón de PFGE respecto al número de cepas resistentes a ciprofloxacino

Tipo PFGE	Nº de cepas	Nº de cepas CIP-R (%)	Nº de cepas CIP-S	Nº cepas CIP-R/ Total CIP-R (%)
Spain ^{23F} -1	22	14 (64)	8	17,1
France ^{9V} -3	18	11 (61)	7	13,4
Spain ¹⁴ -5	3	2 (67)	1	2,4
A	14	5 (36)	9	6,1
B	2	2 (100)	0	2,4
C	3	3 (100)	0	3,7
D	2	2 (100)	0	2,4
E	2	2 (100)	0	2,4
F	4	3 (75)	1	3,7
G	2	2 (100)	0	2,4
H	2	2 (100)	0	2,4
I	2	1 (50)	1	1,2
J	3	1 (33)	2	1,2
K	2	2 (100)	0	2,4
L	3	1 (33)	2	1,2
M	2	0	2	-
N	2	0	2	-
O	2	0	2	-
P	2	0	2	-
R	2	0	2	-
S	2	0	2	-
T	2	0	2	-
V	2	0	2	-
W	3	0	3	-
Único	69	29 (42)	40	35,4
Total	172	82	90	

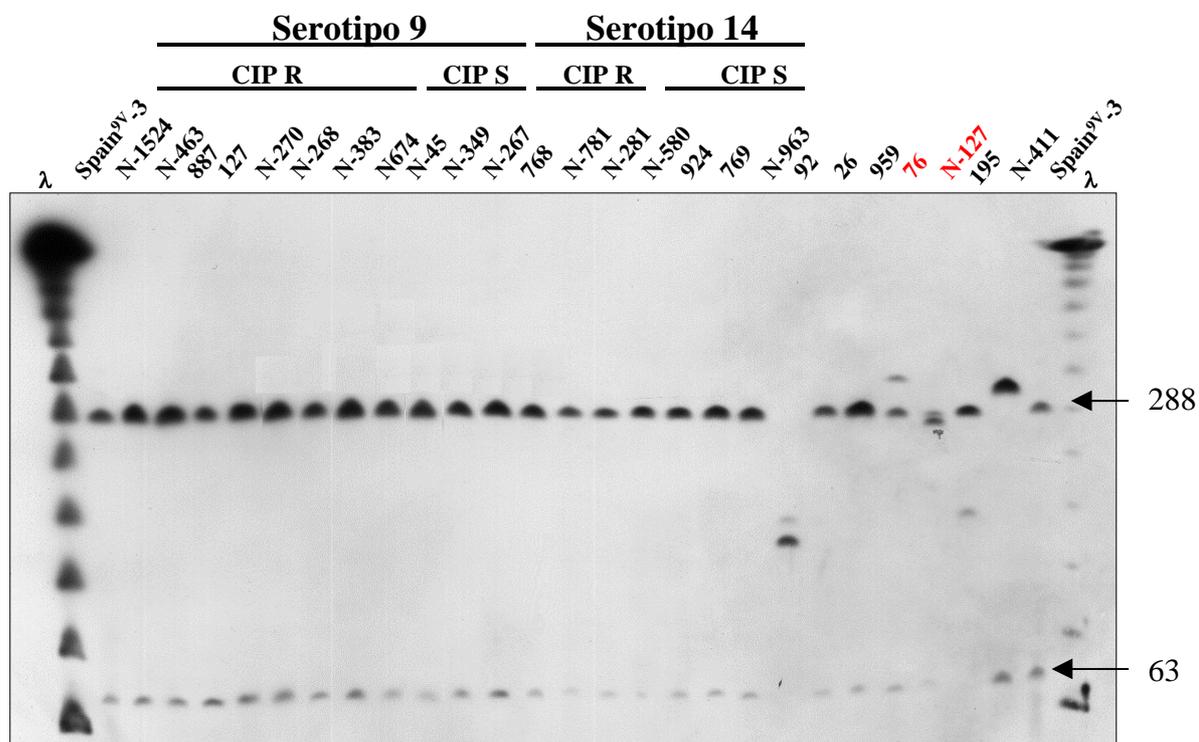
Aislados que presentan el mismo tipo clonal pero expresan diferente serogrupo.

En la cepa N-1524 (en rojo en la figura 24), con serogrupo 3, fue observado que presentaba el perfil de PFGE típico del clon France^{9V}-3. Además, aislados de otro clon no observado previamente y designado con la letra B expresó dos serogrupos diferentes, 3 y 19 (en amarillo en la tabla 21). Además, se observó al igual que ya se había descrito previamente (159, 160, 161, 162), varios aislados que pertenecen a dos clones ampliamente dispersos, Spain^{23F}-1 y France^{9V}-3, y expresaron diferentes serogrupos de los generalmente asociados con esos clones (en amarillo en la tabla 21).

6. Estudio de hibridación con sondas del gen *pmrA*

Todo el ADN de los aislados resistentes y sensibles a ciprofloxacino fue hibridado con la sonda del gen *pmrA*. Independientemente de la CMI a ciprofloxacino la mayoría de los aislados presentaron dos bandas de hibridación positiva como se esperaba, ya que la sonda contiene una secuencia de reconocimiento de la enzima *SmaI* (ver Material y Métodos). En aislados que pertenecen al clon France^{9V}-3 un fragmento de 288kb presentó un banda con fuerte señal de hibridación (figura 28) posiblemente correspondiente a la región 5' del gen que tiene un gran fragmento similar con la sonda usada (ver Material y Métodos). Además, también se observó un fragmento extra de unas 63kb aunque con una señal de hibridación menor (figura 28) que probablemente se corresponda con la región 3' del gen.

Por otro lado, en dos aislados resistentes a ciprofloxacino, la cepa 76 y la N-127 (en rojo en la figura 28), se observaron 3 bandas de hibridación a la sonda del gen *pmrA*. El fragmento extra podría ser debido a la presencia de un gen que presenta una secuencia idéntica al gen *pmrA* en estos aislados.

Figura 28. Hibridación de la sonda del gen *pmrA*.

CIP= ciprofloxacino, R= resistente, S= sensible. Las flechas indican el tamaño en kilobases

V. Discusión

1. Estudio de sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae*.

Como se ha descrito previamente, gemifloxacino presenta mejor actividad que trovafloxacino frente a *S. pneumoniae* (119). La menor actividad de trovafloxacino obtenida en el ensayo no puede ser atribuida a su uso clínico, ya que cuando se recogieron las cepas de los diferentes hospitales este antimicrobiano no estaba comercializado. Esta menor actividad podría ser explicada por una resistencia cruzada entre las quinolonas y la selección de resistencia in vivo que se produce durante las infecciones neumocócicas tratadas con estos antimicrobianos (164, 165).

Por el contrario no se encontró ningún neumococo resistente a gemifloxacino en este ensayo llevado a cabo antes de la comercialización de este antimicrobiano. Gemifloxacino presenta muy buena actividad frente a cepas que incluso presentan una CMI alta a ciprofloxacino. Esta actividad está influenciada por el incremento de la CMI a ciprofloxacino, pero en menor medida que trovafloxacino. Así, el incremento en las CMI₉₀ entre el grupo con CMI = 2 µg/ml y el grupo con CMI ≥ 16 µg/ml fue de 33 veces para trovafloxacino y 8 veces para gemifloxacino. Esto podría ser importante, ya que se ha observado en un estudio realizado en España que la sensibilidad a ciprofloxacino no fue predecible de otros patrones de sensibilidad a otros antimicrobianos (166).

Este incremento en las CMI de las nuevas quinolonas a medida que aumenta la CMI a ciprofloxacino tiene bastante importancia, ya que aunque la incidencia de neumococos resistentes a quinolonas en la actualidad es muy baja, esta podría cambiar al introducir quinolonas de amplio espectro en la práctica clínica, y en particular en la población pediátrica, produciendo un aumento de las cepas resistentes a quinolonas. Si esta resistencia llega a

aumentar, gemifloxacino mejor que trovafloxacino puede tener un buen papel como opción terapéutica, aunque son necesarios estudios clínicos para poder validar esta hipótesis.

2. Determinación de la actividad bactericida sérica de gemifloxacino y trovafloxacino tras dosis oral.

2.1. Elección de cepas

Se emplearon para la realización tanto del ensayo clínico en fase I como el resto de estudios farmacodinámicos, dos cepas de *S. pneumoniae*, una con serotipo 3 (sensible a penicilina y a ciprofloxacino), y otra con serotipo 9 (resistente a penicilina y a ciprofloxacino), debido a que estos dos serotipos son frecuentemente aislados en España y para poder establecer diferencias entre cepas sensibles y resistentes a penicilina y ciprofloxacino.

2.2. Determinación de las concentraciones séricas por método microbiológico (bioensayo) y plasmáticas por HPLC de gemifloxacino y trovafloxacino.

Con respecto a las concentraciones determinadas en suero por bioensayo y en plasma por HPLC de gemifloxacino y trovafloxacino, se encontraron niveles más altos para el bioensayo que para el HPLC para las dos quinolonas. Esto sucedió principalmente en las primeras muestras después de la toma del antimicrobiano, a pesar de las buenas correlaciones encontradas entre ambos métodos y ambos fármacos. Así, la C_{max} alcanzada por gemifloxacino fue de 2,62 µg/ml (bioensayo) frente a 1,57 µg/ml y la C_{max} alcanzada por trovafloxacino fue de 3,75 µg/ml (bioensayo) frente a 2,15 µg/ml.

Comparando con otros estudios previos de gemifloxacino, podemos resaltar que en un estudio reciente (167) se observó una $C_{max} = 2,33 \mu\text{g/ml}$ para una dosis de 320 mg de gemifloxacino mediante bioensayo, dato muy similar al obtenido en nuestro estudio con este mismo método ($C_{max} = 2,62 \mu\text{g/ml}$) para la misma dosis. Los resultados obtenidos por Gee y cols. (167) son muy similares al nuestro. Además de tener una C_{max} muy parecida, se observó una $t_{1/2}$ y AUC_{0-24} similares a nuestros resultados, como comentaremos más tarde, corroborando los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En otros estudios previos (125, 126) se determinaron las características farmacocinéticas de gemifloxacino mediante la técnica de HPLC, observándose una C_{max} de 1,48 y 2,01 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estos niveles son inferiores a los obtenidos en nuestro estudio si se comparan con los datos obtenidos en el bioensayo, pero bastante similares a la C_{max} observada en nuestro estudio (1,57 $\mu\text{g/ml}$) cuando se realizó por el método del HPLC.

Respecto a otros estudios previos de trovafloxacino con dosis de 200 mg, como la utilizada en nuestro estudio, podemos resaltar que en un estudio realizado por el método del bioensayo se observó una $C_{max} = 2,9 \mu\text{g/ml}$ (168), dato similar al obtenido en nuestro estudio en el bioensayo ($C_{max} = 3,75 \mu\text{g/ml}$) para la misma dosis. En otro estudio previo (98) se determinaron las características farmacocinéticas de trovafloxacino mediante la técnica de HPLC donde se observó una C_{max} de 2,3 $\mu\text{g/ml}$. Estos niveles son muy inferiores a los obtenidos en nuestro estudio si se compara con los datos obtenidos en el bioensayo (3,65 $\mu\text{g/ml}$) pero bastante similar a la C_{max} observada en nuestro estudio (2,15 $\mu\text{g/ml}$) cuando se realizó por el método del HPLC.

Así parece observarse en los diferentes estudios que los niveles obtenidos en el HPLC son inferiores a los obtenidos en los diferentes bioensayos. Los niveles superiores en

bioensayo respecto al HPLC han sido descritos en otros estudios realizados previamente con ciprofloxacino (169, 170, 171). Algunos autores atribuyen estas diferencias a la presencia de metabolitos microbiológicamente activos. Mientras los resultados obtenidos por el bioensayo se basan en la actividad antimicrobiana total de la muestra, incluida la actividad del o de los metabolitos, el HPLC diferencia entre las diferentes estructuras producidas durante la transformación metabólica *in vivo*. Por el contrario en otro estudio se expone que la actividad antimicrobiana de los metabolitos no influye en la determinación de la concentración de ciprofloxacino cuando la cantidad de los metabolitos no excede en un rango del 10-12%, como sucede en la orina (172).

En estudios con moxifloxacino, los resultados obtenidos con el bioensayo y el HPLC mostraron una excelente correlación, indicando que la concentración o presencia de metabolitos con actividad no parece ser significativa (173). En nuestro caso gemifloxacino no parece producir metabolitos activos (GlaxoSmithKline, datos no publicados) por lo que los diferentes resultados entre el HPLC y el bioensayo podrían deberse a diferencias metodológicas. Además, las diferencias encontradas entre los diferentes métodos y los diferentes estudios para las dos quinolonas podrían ser debidas a variaciones metodológicas en el cálculo de los parámetros.

En el caso de trovafloxacino se han descrito hasta 3 metabolitos en suero (174), pero su acción antimicrobiana no está demostrada, por lo que las diferencias obtenidas podrían deberse a diferencias metodológicas y cálculo de parámetros al igual que con gemifloxacino.

2.3. Determinación de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos

Debido a la diferencia entre el bioensayo y el HPLC, principalmente en la C_{max} , los resultados obtenidos respecto a este parámetro han sido comentados en el apartado anterior. Respecto a otros parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, hay que destacar que el tiempo en alcanzar la concentración máxima (T_{max}) fue similar ($T_{max} = 1$ hora) para las dos quinolonas, tanto por el método de bioensayo como por el HPLC. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios previamente realizados (98, 99, 100, 125, 126, 167), constatando la rapidez de ambas quinolonas en alcanzar la C_{max} .

Comparando la vida media de eliminación ($t_{1/2}$), se observó que la de gemifloxacino fue superior cuando se realizó por HPLC ($t_{1/2} = 7,80$ h) que cuando se realizó por bioensayo ($t_{1/2} = 5,41$ h). Para trovafloxacino los dos valores obtenidos fueron similares, alrededor de 10 h. Comparando con otros estudios, los resultados obtenidos por Gee y cols (167) para gemifloxacino y obtenidos por bioensayo mostraron que la $t_{1/2}$ fue de 5,94 horas mientras que en nuestro estudio fue de 5,41 horas. En los otros estudios realizados por HPLC los datos obtenidos fueron muy similares (6,65 y 5,87 horas) (125, 126) a los obtenidos en nuestro estudio por bioensayo, dando más validez a los niveles obtenidos por este método que por HPLC.

Debido a los niveles superiores obtenidos en el bioensayo tanto para gemifloxacino como trovafloxacino, las AUC_{0-24h} calculadas con los datos del bioensayo son un 30 % más altas que las AUC_{0-24h} calculadas con los datos del HPLC para ambos antimicrobianos. Así, las AUC_{0-24h} obtenidas por bioensayo para gemifloxacino y trovafloxacino fueron de 11,03 y 31,12 $\mu\text{g h/ml}$, respectivamente, mientras que las obtenidas por HPLC fueron de 7,99 y 21,39

$\mu\text{g h/ml}$, respectivamente. Los valores obtenidos para trovafloxacino, tanto por bioensayo como HPLC, mostraron que su $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ fue unas 3 veces superior a gemifloxacino.

Comparando con otros estudios, nuevamente el valor obtenido en gemifloxacino por bioensayo ($11,03 \mu\text{g h/ml}$) es similar al obtenido por otro estudio realizados por esta misma técnica ($10,38 \mu\text{g h/ml}$) (167), mientras que el valor obtenido por HPLC ($7,99 \mu\text{g h/ml}$) es más similar a otro estudio realizado por HPLC ($8,49 \mu\text{g h/ml}$) (126). Para trovafloxacino el valor obtenido por bioensayo ($31,12 \mu\text{g h/ml}$) en nuestro estudio fue bastante similar a otro estudio (98) ($29,2 \mu\text{g h/ml}$) realizado por HPLC, mientras que este valor fue algo superior al $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ obtenida en nuestro estudio por HPLC ($21,39 \mu\text{g h/ml}$). Así, se puede observar para los diferentes estudios que los valores por bioensayo son superiores a los realizados por HPLC

Es conocido por todos que el $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CMI}$ puede ser utilizado como indicador de la actividad farmacodinámica de las fluorquinolonas frente a diferentes patógenos (175). Se ha observado que la erradicación bacteriana es muy efectiva cuando ciprofloxacino era administrado de forma intravenosa para obtener una $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CMI} \geq 125$ (176). Además en otros estudio con pacientes tratados con ciprofloxacino por vía intravenosa en el cual el $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CMI} > 100$, se observó que no se desarrollaron resistencias durante la terapia (177). Hay que mencionar que estos ensayos fueron realizados principalmente en pacientes con infecciones nosocomiales del tracto respiratorio inferior de las unidades de cuidados intensivos, a menudo infectados por bacilos gram negativos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*

El $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CMI}$ requerida para las nuevas fluorquinolonas para el tratamiento de infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad o la exacerbación aguda de la bronquitis

crónica causadas por *S. pneumoniae* no está definida. Según algunos autores la AUC_{0-24h}/CMI de las nuevas fluorquinolonas frente a *S. pneumoniae* raramente se acerca a 125, pero los ensayos clínicos han demostrado que estos agentes son efectivos en el tratamiento de infecciones neumocócicas (178, 179). Debido a esto, recientes estudios rebajan el punto de corte de predicción de eficacia clínica de las nuevas quinolonas para *S. pneumoniae* hasta una AUC_{0-24h}/CMI de 35-63 (180, 181).

Teniendo en cuenta las premisas expuestas en el párrafo anterior, si utilizamos el punto de corte $AUC_{0-24h}/CMI \geq 125$, las diferencias farmacocinéticas encontradas en nuestro estudio (C_{max} y AUC_{0-24h} de trovafloxacino superiores a gemifloxacino) no se trasladan a los parámetros farmacodinámicos calculados con los datos obtenidos por ambos métodos (bioensayo y HPLC), tanto para la C_{max}/CMI y el AUC_{0-24h}/CMI para ambas cepas con gemifloxacino, como para trovafloxacino con la cepa con serotipo 3, ya que los parámetros obtenidos están muy por encima de los valores establecidos si se utilizan como punto de corte de predicción de eficacia clínica, una $C_{max}/CMI \geq 10$ (181) y $AUC_{0-24h}/CMI \geq 125$ (182). Pero no es el caso para la cepa con serotipo 9 y trovafloxacino, donde los parámetros farmacodinámicos están por debajo de los mencionados puntos de corte de predicción de eficacia clínica.

Si por el contrario se utiliza una $AUC_{0-24h}/CMI \geq 35-63$ como índice predictor de eficacia clínica, las dos quinolonas tanto para la cepa con serotipo 3 como con serotipo 9 están por encima de dicho punto de corte. Así, según lo publicado, una $AUC_{0-24h}/CMI \geq 35-63$ para las nuevas fluorquinolonas parece ser suficiente para erradicar *S. pneumoniae* multirresistente y prevenir el desarrollo de resistencias durante la terapia. Aunque son necesarios extrapolar estos valores de AUC_{0-24h}/CMI a estudios clínicos para confirmar estos resultados.

El mayor aumento que se produce en la CMI a trovafloxacino que en la de gemifloxacino por el incremento de la CMI de ciprofloxacino frente a *S. pneumoniae*, ha sido descrita previamente en el primer apartado (183). Cuando consideramos los parámetros farmacodinámicos para la predicción de eficacia clínica con las quinolonas, el incremento de 4 diluciones en la CMI de ciprofloxacino en las cepas utilizadas en el estudio (de la categoría sensible a resistente) hace disminuir cinco veces el valor de los parámetros farmacodinámicos en el caso de trovafloxacino (C_{max}/CMI (62 vs 14), AUC_{0-24h}/CMI (518 vs 124)) y a la mitad en el de gemifloxacino (C_{max}/CMI (174 vs 87), AUC_{0-24h}/CMI (735 vs 367)).

Este puede tener consecuencias clínicas y terapéuticas, ya que aunque la CMI de trovafloxacino frente las cepa resistente a ciprofloxacino fue de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, si utilizamos la CMI_{90} de trovafloxacino para las cepas resistentes a ciprofloxacino con $CMI > 16 \mu\text{g/ml}$ (4 $\mu\text{g/ml}$) obtenidas en el estudio del primer apartado (183) y aplicando AUC_{0-24h}/CMI con la AUC_{0-24h} obtenida por bioensayo, obtendríamos un valor de 7,78 $\mu\text{g h/ml}$, que estaría por debajo de 35-63 utilizado como índice predictor de eficacia clínica. Mientras que realizando la misma operación para gemifloxacino ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$) obtenemos un valor de 44,1 $\mu\text{g h/ml}$, valor que estaría en el rango de predicción de eficacia clínica de 35-63. Por lo que se puede observar una gran reducción de la predicción de eficacia mediante los parámetros farmacodinámicos para las cepas con altos valores de CMI frente a ciprofloxacino.

Si comparamos nuestros resultados con diferentes estudios con diferentes patologías podemos observar que en un estudio multicéntrico se comparó las mismas dosis utilizadas en nuestro estudio, gemifloxacino 320 mg y trovafloxacino 200 mg en 571 pacientes con neumonías adquiridas en la comunidad (184). El tratamiento consistió en una dosis al día de las dosis citadas anteriormente durante 7 días aunque en algunos casos se alargó hasta los 14

días. La respuesta clínica observada al final de la terapia fue del 95,8% para gemifloxacino y del 93,6% para trovafloxacino, mientras que la tasa de curación clínica en el seguimiento fue del 87% para gemifloxacino y del 81% para trovafloxacino existiendo diferencias significativas. Estos porcentajes se incluyen diferentes microorganismo a *S. pneumoniae* también causantes de la misma patología. Si nos centramos en *S. pneumoniae*, gemifloxacino consiguió erradicar al 100% de los *S. pneumoniae* (18/18) mientras que se observó un fallo en la terapia en el caso trovafloxacino, es decir consiguió erradicar el 93% de los *S. pneumoniae* (14/15). Este fallo se debía a una cepa que presentaba una CMI = 8 µg/ml a trovafloxacino y de 0,25 µg/ml a gemifloxacino. Este hecho unido a los resultados obtenidos en nuestro estudio hace predecir posibles fallos en la terapia con las nuevas quinolonas como ya se ha visto en la literatura de fallos en la terapia con levofloxacino en el tratamiento de *S. pneumoniae* resistente a quinolonas (185) y la aparición de brotes nosocomiales de *S. pneumoniae* resistente a quinolonas (186). En ambos casos gemifloxacino presentaba la mejor actividad de todas las quinolonas frente las cepas causantes de dichos fallos en la terapia, mostrándose como la mejor alternativa frente las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a quinolonas.

Así, si analizamos los diferentes estudios se puede observar que ciprofloxacino no debería ser utilizado como marcador de la resistencia a las nuevas quinolonas, por lo que una cepa resistente a ciprofloxacino no tiene por que ser resistente a otras quinolonas de nuevas aparición. Además, en el primer apartado hemos mencionado que la resistencia a ciprofloxacino afecta en mayor medida a trovafloxacino que a gemifloxacino. Así, las nuevas quinolonas deben ser valoradas independientemente ya que se pueden obtener cepas muy resistentes a ciprofloxacino y a otras quinolonas pero que sean sensibles a quinolonas muy activas como gemifloxacino.

Por otro lado, gemifloxacino mantiene la actividad farmacodinámica observada por trovafloxacino frente la cepa sensible con serotipo 3 ($C_{max}/CMI = 62$ con bioensayo) y para la cepa resistente con serotipo 9 ($C_{max}/CMI = 87$ con bioensayo). Mientras, para trovafloxacino frente la cepa resistente con serotipo 9 se observó una $C_{max}/CMI = 15$ con bioensayo. Este mantenimiento de la actividad farmacodinámica para ambas cepas (C_{max}/CMI mucho mayor de 10) es importante por que ambos fármacos son concentración-dependiente. |

2.4. Determinación de los títulos bactericidas séricos

La medida de la actividad bactericida *ex vivo* permite comparar directamente las propiedades farmacodinámicas (187) en la evaluación de nuevos fármacos (188), reflejando la relación entre la actividad *in vitro* y las concentraciones alcanzables *in vivo* (189). Esto puede ser importante en situaciones donde la actividad bactericida del torrente sanguíneo juega un papel importante (190), como en la neumonía bacteriémica por neumococos (191). Dependiendo de las modificaciones realizadas al test bactericida sérico, éste puede aportar

una valoración cuantitativa de la actividad bactericida relativa a la CMB (título bactericida sérico, TBS), una valoración dinámica de la tasa de muerte a lo largo del tiempo (tasa bactericida sérica), o ambos, así como la magnitud de la actividad bactericida sérica y su duración (área bajo la curva de los títulos bactericidas, AUBC). Así, el AUBC es la combinación de tres factores: actividad antimicrobiana, las concentraciones libres alcanzadas por el fármaco y la vida media.

A pesar de que un TBS > 8 ha sido considerado adecuado y predictor de eficacia clínica (192), el NCCLS no ha establecido este valor para infecciones neumocócicas. Debido a esto se han establecido diferentes valores de TBS de predicción de eficacia según la bacteria y el tipo de infección. En el caso de las quinolonas, hay muy pocos estudios que determinen la actividad bactericida en el suero frente a *S. pneumoniae* (187, 190), y no hay ningún estudio que determine la actividad bactericida de gemifloxacino o trovafloxacino.

Con respecto a los títulos bactericidas, a pesar de que la AUBC predictiva con los datos obtenidos por el bioensayo es mayor que la AUBC obtenida por HPLC (debido a los mayores niveles observados en el bioensayo), no se observaron diferencias importantes entre los títulos bactericidas predictivos calculados con los datos obtenidos por ambos métodos cuando se analizaron en cada tiempo de la muestra (tablas 9-12). Esto podría ser debido al mayor peso específico de la CMB que de los niveles en suero en la expresión $1/2^n$ utilizada para calcular los títulos predictivos, donde n es el número de diluciones dobles que los niveles alcanzados en suero por el antimicrobiano están por encima del valor de la CMB. Debido a este hecho, la diferencia entre niveles medidos por HPLC y bioensayo en cada tiempo de muestreo desaparece cuando consideramos los títulos bactericidas predictivos calculados por HPLC vs bioensayo como parámetros farmacodinámicos.

El problema se plantea en los TBS experimentales, ya que mientras que son similares para gemifloxacino (\pm una dilución) a los predictivos frente a la cepa sensible a ciprofloxacino (serotipo 3) y alrededor de 2 diluciones más bajas que los predictivos frente la cepa resistente (serotipo 9) para gemifloxacino y frente la cepa sensible (serotipo 3) para trovafloxacino, existe una total discrepancia entre los TBS experimentales y predictivos con trovafloxacino y la cepa resistente a ciprofloxacino. En este caso, solo se observa TBS experimental en la muestra de la primera hora, mientras que se observan unos TBS predictivos hasta las 8 h si son obtenidos por HPLC y hasta las 12 h si lo son por bioensayo. La razón de esto podría ser la concentración de suero final (80 %) utilizada en los pocillos de las placas microtiter (medio de dilución: 80 % suero y 20 % caldo) con el fin de simular las condiciones *in vivo* lo mejor posible (191). La medición de los niveles de las quinolonas fue unido a las concentraciones de suero final de ese 80 % en los pocillos en una magnitud dependiente de la tasa de unión a proteínas (alrededor del 70 % para ambas quinolonas). Como sabemos el fármaco libre es la fracción microbiológicamente activa (193), lo que significa que solo el 44% del fármaco en el pocillo presenta actividad microbiológica. Este efecto no es aparente cuando las CMI son muy bajas (CMI de gemifloxacino frente a la cepa sensible = 0,015 $\mu\text{g/ml}$), pero se incrementa con gemifloxacino y la cepa resistente y con trovafloxacino y la cepa sensible (CMI = 0,03 y 0,06 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), y el efecto es claramente observable cuando la CMI es más alta (CMI de trovafloxacino frente a la cepa resistente = 0,25 $\mu\text{g/ml}$), resultando en una falta de TBS experimentales a pesar de observarse TBS predictivos positivos. Los resultados obtenidos en los TBS vienen apoyados por la pérdida de actividad observada cuando las cepas del estudio se les realizó la CMI con suero

(tabla 4b) sobre todo en el caso de trovafloxacino y frente a las dos cepas donde la CMI aumentó 2 diluciones cuando se realizó con suero.

La inclusión del suero humano en el medio del ensayo ha sido utilizado (191, 194, 195) para evitar una falsa evaluación de la actividad bactericida del suero cuando el caldo se utiliza como diluyente (196). Esto es importante cuando los antimicrobianos presentan altas tasas de unión a proteínas como es el caso de nuestro estudio, donde el 70 % de unión a proteínas ha sido utilizado como umbral en el cual los puntos de corte de sensibilidad al antimicrobiano es reducida al 50 % (197). Esto es porque los TBS predictivos obtenidos por parámetros farmacocinéticos y la sensibilidad, que reflejan la sobreestimación de la actividad bactericida son diferentes a los experimentales, que muestran la reducción de la actividad microbiológica relacionada con la unión a proteínas y/o el efecto directo del suero humano en la sensibilidad *in vitro* como una reducción de la sensibilidad para trovafloxacino, pero no gemifloxacino.

Desde este punto de vista, otra vez, gemifloxacino presenta una actividad bactericida *ex vivo* similar frente a la cepa resistente que trovafloxacino frente a la cepa sensible. Así, si comparamos el TBS experimental observado cuando se alcanza la C_{max} (1 hora) en las dos quinolonas, gemifloxacino presentó un TBS de 32 frente a la cepa sensible y un TBS de 8 frente a la cepa resistente. Este valor fue el mismo que se observó para trovafloxacino frente la cepa sensible, mientras que para la cepa resistente se observó un TBS de 2 a la 1ª hora.

Al igual que en los parámetros farmacodinámicos, el incremento de 4 diluciones en la CMI a ciprofloxacino produce diferentes efectos sobre la actividad bactericida *ex vivo* de gemifloxacino vs trovafloxacino cuando se compara frente a las cepas sensible y resistente. Para gemifloxacino, se observó una reducción de 2 veces en el valor de la AUBC en la cepa

resistente a ciprofloxacino con respecto a la AUBC de la cepa sensible: AUBC predictivos (165 vs 72 o 216 vs 102 cuando se utilizó HPLC o el bioensayo, respectivamente). Pero cuando se tuvieron en cuenta las AUBC experimentales, se produjo un descenso de la actividad en 5.6 veces (168 vs 30), probablemente debido a la unión a proteínas experimentada *in vitro*.

Sin embargo, en el caso de trovafloxacino, se observaron unas disminuciones superiores en las AUBC predictivas (5,3 o 7,5 veces, cuando se consideró el bioensayo o el HPLC, respectivamente) al comparar la cepa sensible con la resistente (191 vs 36 o 120 vs 16). Pero se produjo una reducción de 11 veces en las AUBC experimental (22 vs 2). Esto podría tener consecuencias terapéuticas en la dosificación, ya que la AUBC parece ser un índice más sensible de los efectos farmacodinámicos que el AUC (198), proporcionando una ayuda más precisa para el ajuste de la dosificación de los antimicrobianos (199), o al menos para aquellos agentes que presenten una actividad concentración-dependiente como las quinolonas (200) en infecciones donde la actividad bactericida necesita ser optimizada (como en la bacteriemia neumocócica). Así incluso podría plantearse que el intervalo de dosificación de 24 h de trovafloxacino no es adecuado frente a *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino con altas CMI.

Desde el punto de vista de las AUBC experimentales, gemifloxacino presenta una actividad bactericida *ex vivo* similar frente a la cepa resistente a ciprofloxacino que trovafloxacino frente a la cepa sensible (30 vs 22). Estos hechos pueden ser importantes ya que en un estudio previo se observó que la sensibilidad a ciprofloxacino no puede ser predicha por los patrones de sensibilidad a otros antimicrobianos (166).

2.5. Determinación de la tasa de muerte ex vivo de *S. pneumoniae*, en sueros de voluntarios (en presencia y ausencia de leucocitos polimorfonucleares) tratados con gemifloxacino y trovafloxacino.

El análisis de las curvas de letalidad muestra que gemifloxacino presenta una mayor actividad bactericida que trovafloxacino frente a ambas cepas de *S. pneumoniae* en las muestras de suero de la 1ª hora después de la dosis, lo que equivale a que dicho suero presente aproximadamente la Cmax alcanzada por las dos quinolonas. Así, para la cepa resistente a penicilina y ciprofloxacino (serotipo 9), se observó a las 3 horas de incubación con la muestra de suero de la 1ª hora una reducción de 2 logaritmos aproximadamente en el recuento de viables cuando fue ensayado con gemifloxacino, mientras que para trovafloxacino la reducción fue de un logaritmo. Para la cepa sensible a penicilina y a ciprofloxacino (serotipo 3) hubo una reducción de 2 logaritmos aproximadamente en el recuento de viables cuando fue ensayado con gemifloxacino, mientras que para trovafloxacino la reducción fue de 1,5 logaritmos.

Estas reducciones obtenidas en nuestro estudio fueron algo inferiores para gemifloxacino y trovafloxacino cuando se comparó con otro estudio (201) que también enfrentó la Cmax de ambas quinolonas a cepas sensibles y resistentes a penicilina y ciprofloxacino. Este hecho podría explicarse por el alto porcentaje de suero (80%) utilizado

en nuestro estudio frente al 20% que se utilizó en las curvas estudiadas por Joyanes y cols. Este hecho produciría una menor cantidad de fármaco libre para poder ejercer su acción lo que se traduciría en una menor reducción en el número de Log_{10} UFC/ml.

En las muestras de suero de las 24 h después de la dosis, lo que equivale a unas concentraciones aproximadamente alrededor de la CMI (concentración a las 24 horas = 0,06 y 0,43 $\mu\text{g/ml}$ para gemifloxacino y trovafloxacino, respectivamente), no hubo disminución o una ligera disminución en el recuento de viables para ambas quinolonas, gemifloxacino y trovafloxacino, y para ambas cepas de *S. pneumoniae*. Al igual que la primera hora después de la dosis, al realizar las curvas con un 80% de suero se traduce en una reducción de la actividad donde era de esperar mejor actividad ya que hay concentraciones próximas a la CMI. Así, los resultados obtenidos para trovafloxacino y gemifloxacino disminuyeron a medida que se disminuyó la concentración libre en el plasma, demostrando así la naturaleza concentración-dependiente de las quinolonas.

Por otro lado, comparando los resultados entre curvas con suero y suero-PMN en las muestras de suero de 1 hora después de la dosis, la adición de células PMN no incrementó las tasas de muerte de ninguna de las dos quinolonas. Este fenómeno fue advertido en otro estudio (201) donde también se observó que la actividad bactericida de las quinolonas estudiadas (gemifloxacino, trovafloxacino y ciprofloxacino) no era afectada por la presencia de PMN, confirmando los datos obtenidos en nuestro estudio.

Aunque se ha visto que la concentración intracelular de gemifloxacino y trovafloxacino en células PMN es 8 y 9 veces, respectivamente, mayores a la concentración extracelular y que son activas intracelularmente frente a *S. aureus*, (202, 203) en nuestro

estudio no se observaron diferencias significativas entre las curvas con suero y las de suero + PMN.

Este hecho podría atribuirse a un enmascaramiento de la actividad intracelular de los PMN producido por la actividad intrínseca ejercida por el antimicrobiano sobre la acción ejercida por los PMN. Aunque hay que tener en cuenta que dicha actividad intracelular ha sido valorada en diferentes estudios (202, 204) eliminando la fracción bacteriana extracelular, a diferencia de nuestro estudio donde sí que se estudia dicha fracción que podría enmascarar la actividad intracelular.

Por otro lado, se ha visto que algunos betalactámicos (amoxicilina-ácido clavulánico, sanfetrinem) potencian la acción fagocítica y la acción bactericida intracelular de los PMN (204, 205) obteniendo diferencias significativas entre las curvas de suero y suero-PMN con amoxicilina y ácido clavulánico. Así, estos betalactámicos al actuar sobre las PBP podrían ejercer un cambio morfológico estructural sobre *S. pneumoniae*, lo que conllevaría cambios en la superficie celular y una alteración en la sensibilidad hacia la acción de los PMN facilitando su fagocitosis y/o acción intracelular (204, 206). Este hecho podría no suceder en las quinolonas ya que estas actúan a nivel de la DNA-girasa, y por lo tanto podría explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio. Además se ha visto que la pre-exposición del sanfetrinem frente a los PMN implica que *S. pneumoniae* sea más eficazmente fagocitado, de este modo se podría explicar que este betalactámico actuase directamente sobre los PMN, posiblemente interfiriendo en alguna función celular de la membrana y por lo tanto aumentando la fagocitosis de los neumococos (204).

Hay que tener en cuenta que el efecto intrafagocítico de los antimicrobianos está intracelularmente influenciado por múltiples factores, como pueden ser la entrada y

localización intracelular adecuada del antimicrobiano, las propiedades antibacterianas del antimicrobiano (mecanismo de acción y tipo de actividad), efecto del ambiente intracelular sobre la actividad biológica y sensibilidad del antimicrobiano y el efecto del antimicrobiano sobre la función celular como la fagocitosis. Como se ha expuesto anteriormente, los antimicrobianos pueden interaccionar con las células PMN fundamentalmente de dos formas: indirectamente, produciendo modificaciones en los microorganismos que hagan que el comportamiento de los PMN frente a los mismos sea distinto o directamente actuando sobre las funciones de estas células.

3. Determinación del efecto postantibiótico (EPA) de gemifloxacino y trovafloxacino.

Las dos quinolonas fueron capaces de inducir un EPA significativo (mayor de 0,5 horas) en las dos cepas ensayadas a todas las concentraciones salvo a la concentración de 1 x CMI en la cepa resistente. Estos resultados concuerdan con los pocos resultados obtenidos hasta el momento sobre el estudio del efecto postantibiótico de gemifloxacino (119, 207) y los de trovafloxacino (119, 208, 209), que destacan el hecho de que estos antimicrobianos presenten un EPA frente a *S. pneumoniae* y otros patógenos (120).|

Por otro lado, tanto para gemifloxacino como para trovafloxacino se observa una relación entre la concentración de antimicrobiano y la duración del EPA, siendo esta mayor a medida que aumenta la concentración del mismo. Se confirma de este modo que el EPA y su duración están correlacionados con la concentración ensayada de antimicrobiano, lo cuál está de acuerdo con lo observado en otros estudios (119, 207, 208, 209).

Un factor a tener en cuenta cuando se estudia el EPA es que en algunos casos, cuando se estudian diferentes concentraciones por encima de la CMI, esas concentraciones no se

alcancen en el organismo. En nuestro caso para la cepa resistente a ciprofloxacino, tiene una CMI = 0,03 µg/ml a gemifloxacino y 0,25 µg/ml a trovafloxacino, en el caso de 10 x CMI esas concentraciones si se alcanzan en el organismo. No sucedería lo mismo para las dos cepas estudiadas en el caso de ciprofloxacino (CMI = 1 y 4 µg/ml).

No obstante, debemos tener en cuenta que existe una gran variedad de factores que pueden alterar la presencia y/o duración del mismo. Estos factores están relacionados con el microorganismo, el antimicrobiano, y con las condiciones experimentales. En general, se puede decir que todos los factores que influyen en la actividad del antibiótico influyen en la duración del EPA. Pero además de estos factores, otros como son el medio de cultivo, el pH, la concentración del inóculo inicial, la fase de crecimiento, la concentración de antimicrobiano, el tiempo de exposición, el método de eliminación del antimicrobiano, y el método de cuantificación, también repercuten en el retraso del crecimiento.

A esto hay que añadir que el EPA es siempre más prolongado *in vivo* que *in vitro*, porque el tiempo de generación bacteriano en los animales y en el hombre es más lento y, además, en los seres vivos se cuenta con la presencia de PMN y otros mecanismos defensivos que ayudan al antibiótico en su acción.

Por otro lado, el mecanismo preciso por el que se establece el EPA aun no es del todo conocido, pero parece ser que están implicados diversos factores. Aunque el término EPA fue definido para enfatizar el hecho de que la previa exposición al fármaco es la causante del fenómeno, otras teorías se inclinan a destacar el papel de las concentraciones subinhibitorias del antibiótico, al que están expuestas las bacterias tras su eliminación del medio, y proponen que los estudios sobre el EPA se hagan a concentraciones inferiores a la CMI (210).

Se considera un fenómeno que se desarrolla fundamentalmente dependiendo de la combinación antimicrobiano-microorganismo y, en muchos casos, es multifactorial. Se asume que el EPA es el resultado de la inhibición del crecimiento bacteriano como consecuencia de una prolongación del tiempo de latencia. Sin embargo, podría deberse a un aumento en el tiempo de generación o, incluso, una combinación de ambos. El segmento de la fase de crecimiento que está afectada puede calcularse tomando muestras a intervalos muy cortos. Esto ha revelado que en la mayoría de los casos sucede realmente una prolongación de la fase de latencia, excepto para determinados antimicrobianos, como ciprofloxacino, que parece que induce una prolongación en el tiempo de generación (211).

Las bases que explican el EPA, como se ha mencionado, aún no se conocen con precisión, pero existen varias teorías que tratan de explicar este fenómeno. La duración del efecto postantibiótico podría estar relacionada con la persistencia del fármaco en la diana de acción. En este sentido varios autores sugieren que el tiempo necesario para la liberación del antibiótico de sus receptores sería el tiempo de recuperación del crecimiento bacteriano (212). Esta explicación se ha propuesto para el caso de las quinolonas, y se ha sugerido que el EPA estaría condicionado por el tiempo que estas tardan en disociarse de sus receptores y difundir fuera de la bacteria (213).

Otra teoría que se apunta es la reparación del daño no letal de las estructuras bacterianas, tiempo de “resíntesis” de las proteínas y enzimas afectados por la acción del fármaco (214) en la que podrían encuadrarse a los betalactámicos (215).

4. Determinación de la influencia de suero en la sensibilidad de gemifloxacino y trovafloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae*.

A pesar que otros estudios concluyen que la presencia de suero humano no influye o influye poco en la actividad intrínseca de las nuevas quinolonas (216, 217) frente a *S. pneumoniae*, los resultados de este estudio sugieren que la sentencia anterior no puede ser generalizada a todas las quinolonas, ya que la presencia de suero puede tener un impacto en la tasa de resistencia en los puntos de corte previamente definidos. También hay que tener en cuenta que las diferencias observadas en nuestro estudio respecto a los anteriores pueden estar basadas en el alto porcentaje de suero utilizado en nuestro estudio (80%) frente al utilizado en otros estudios (hasta un 50%) (214, 217).

Por otro lado, aunque no hay estudios con gemifloxacino ni trovafloxacino con *S. pneumoniae*, se ha visto que para trovafloxacino la presencia de suero puede producir una disminución en la actividad hasta de 32 diluciones dependiendo de la especie estudiada (218). Por otro lado, la presencia de suero no tiene influencia en la CMI moxifloxacino (217), confirmado en nuestro departamento en un estudio ($CMI_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, en caldo y suero) (219), donde además observamos un porcentaje similar de resistencia a moxifloxacino en todas los grupos de CMI a ciprofloxacino cuando las cepas fueron estudiadas con caldo o con suero.

Por el contrario, para gemifloxacino y trovafloxacino la influencia del suero puede tener más implicaciones, ya que cuando la CMI a ciprofloxacino es $\geq 4 \mu\text{g/ml}$, sobrepasa los puntos de corte establecidos. Así, considerando ambos factores, el efecto combinado del incremento de la CMI a ciprofloxacino y la presencia de suero humano, gemifloxacino presenta los valores más altos para la CMI_{90} (0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$, sin y con suero respectivamente), mientras que trovafloxacino presenta unos valores de $\text{CMI}_{90} = 2$ y 8 $\mu\text{g/ml}$, sin y con suero respectivamente. A consecuencia de esta disminución de la actividad se produce una serie de implicaciones que afectan al porcentaje de cepas resistentes. Así para gemifloxacino el porcentaje de resistentes totales pasó de 0% cuando las CMI fueron realizadas con caldo hasta el 7% cuando fueron realizadas con suero. Mientras que para trovafloxacino pasaron de 22% cuando las CMI fueron realizadas con caldo hasta el 38% cuando fueron realizadas con suero.

Por lo que se deduce, esta reducción de la actividad microbiológica está relacionada con la unión a proteínas y/o el efecto directo del suero humano en la sensibilidad in vitro de las quinolonas. Así trovafloxacino y gemifloxacino presentan una alta unión a proteínas (70%) que podría producir una reducción de la actividad cuando son ensayadas con suero, que si se estudia en términos de porcentaje a resistencia, afecta más a trovafloxacino que a gemifloxacino por la mejor actividad de esta última. Por otro lado no hay que descartar un posible efecto directo del suero sobre la actividad de las quinolonas, debido a que moxifloxacino, si bien no presenta una unión a proteínas tan alta (50%) (180), no se ve afectada por la presencia de suero, cosa que si sucede en el caso de ciprofloxacino con una unión a proteínas del 30% (180). Por lo que de alguna forma por la estructura química de moxifloxacino diferente a gemifloxacino, trovafloxacino y ciprofloxacino, el efecto directo del suero no se observaría en esta quinolona y si que podría observarse en las otras.

Estas diferencias confirman los resultados obtenidos en los apartados anteriores donde la presencia de suero y por lo tanto la alta unión a proteínas de gemifloxacino y trovafloxacino y/o el efecto directo del suero produce la diferencia de resultados obtenidos en los TBS experimentales y predictivos

5. Estudio para la caracterización molecular de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino.

En nuestro estudio, los neumococos resistentes a ciprofloxacino mostraron gran diversidad genética; así, fueron identificados 44 patrones diferentes por EFCP entre los 82 neumococos resistentes a ciprofloxacino, dentro de los cuales estaban incluidos tres clones ampliamente extendidos internacionalmente. De estos 44 patrones de los aislados resistentes a ciprofloxacino, 29 fueron clones únicos (representados por un sólo aislado). Hay que resaltar que 8 clones resistentes a ciprofloxacino también aparecieron en las cepas sensibles a ciprofloxacino obtenidas en los mismo sitios y durante el mismo periodo. Además, un gran número de clones, incluyendo dos clones ampliamente diseminados, presentaron aislados con un amplio rango en la CMI a ciprofloxacino (tabla 21). Aunque que la mayoría de los aislados analizados en este estudio presentaron una baja CMI a ciprofloxacino (4 µg/ml), se observó que la diversidad genética se mantiene incluso entre los aislados más resistentes. Esta situación está en contraste con lo que sucede en el caso de la resistencia a penicilina, donde se observa un número pequeño de clones entre las cepas con alta resistencia a penicilina (220).

Aunque ciprofloxacino fue comercializado en España en 1988, la diversidad genética entre los *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino está todavía ampliamente dispersa entre los aislados clínicos obtenidos de 1996 a 1999. Estos descubrimientos sugieren que los

neumococos resistentes a ciprofloxacino son el producto de mutaciones independientes en la población de neumococos que han sido seleccionadas por los fármacos, presumiblemente durante el tratamiento con estos antimicrobianos. El mecanismo de resistencia más probable implica la alteración de las dianas de las quinolonas a través de mutación (139, 140, 221) o de transformación con genes derivados de otros organismos (222). Este hecho podría explicar la diversidad clonal de los aislados de *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino observada en este estudio y previamente estudiada (134, 135). El hecho de que aproximadamente el 93% (12/172) de las cepas con CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ fueron aisladas en adultos, se correlaciona bien con el uso exclusivo de fluorquinolonas en este grupo de edad (134, 135, 136). Los cinco aislados pediátricos resistentes a ciprofloxacino estudiados en detalle no mostraron ser una muestra representativa de los clones internacionales frecuentemente aislados en niños, aunque un aislado pertenecía al clon France^{9V}-3 y dos al clon Spain^{23F}-1, los otros dos presentaron clones únicos. Esta resistencia podría ser posible por otro mecanismo como puede ser las bombas de expulsión, que también están presentes entre algunos de los aislados clínicos de neumococos resistentes (138, 223) aunque su mecanismo todavía no es bien conocido.

Respecto al serogrupo y clones de PFGE, en la tabla 21 se identifican aislados que a pesar de presentar el mismo tipo clonal, definido por EFCP, expresan diferentes serotipos. Particularmente es interesante la adquisición del tipo capsular 3 por un aislado representativo del clon France^{9V}-3, ya que el cambio a este serotipo en un miembro del Spain^{23F}-1 clon podría tener un gran impacto sobre la virulencia (162). Estos aislados son el resultado de un cambio capsular “capsular switch” *in vivo* a través de mecanismos de transformación o transducción con ADN extraño (161, 162, 163). Además de la diversidad genética de los aislados resistentes a ciprofloxacino, también es importante el hecho de que una gran

proporción (25 de 82), es decir el 30% de los neumococos resistentes a ciprofloxacino, pertenecen a dos clones internacionales multirresistentes ampliamente extendidos, el clon France^{9V}-3 y el Spain^{23F}-1. A pesar del gran número, no hay una presencia mayor de estos clones entre las cepas resistentes a ciprofloxacino en relación a las cepas sensibles seleccionados por su similitud lo más cercana posible en términos de antibiotipo y serotipo (tabla 21). Esto sugiere que la alta prevalencia de estos clones entre las cepas resistentes a ciprofloxacino viene reflejada por su alta prevalencia en la población, ya que estos clones no están más representados de lo que se podría esperar si se asume que los aislados resistentes a ciprofloxacino están siendo seleccionados a partir de los clones existentes. Existe una gran cantidad de datos que indican que estos dos clones son muy frecuentes entre los neumococos que colonizan la nasofaringe en los niños (155) y también entre los que causan enfermedades neumocócicas (224) en adultos como en niños. Por otra parte, estos aislados resistentes a ciprofloxacino están ya ampliamente extendidos por España, ya que miembros del clon France^{9V}-3 fueron aislados en nueve hospitales mientras que miembros del clon Spain^{23F}-1 fueron identificados en diez hospitales. La asociación de la resistencia a ciprofloxacino con estos clones epidémicos internacionales podría garantizar la rápida diseminación geográfica de la resistencia a fluorquinolonas a través de la comunidad en España como en otros países.

6. Estudio de hibridación con sondas del gen *pmrA*

Respecto a la implicación del producto del gen *pmrA* en la resistencia, el incremento de los niveles de resistencia debido a la duplicación de los genes en los cromosomas ha sido previamente documentado (225). También se ha demostrado que la introducción de un plásmido que contiene el gen de estafilocócico *norA* en *E. coli*, le confiere un incremento en la resistencia a ciprofloxacino dependiente del número de copias (226). Debido a que *NorA* y *PmrA* son ambas bombas de expulsión, la cuestión es si es posible que la amplificación del número de copias en el cromosoma del gen *pmrA* haya contribuido a aumentar la resistencia a ciprofloxacino. Sin embargo la hibridación de las bandas con *pmrA* no mostró intensidades diferentes entre los aislados con diferente CMI a ciprofloxacino (figura 27), excluyendo la hipótesis de que la amplificación del gen es responsable de la resistencia. Aunque no hay que descartar que la bomba *PmrA* juegue un papel en la resistencia debido a un mecanismo de sobreexpresión resultante de mutaciones en el promotor.

Por otro lado hay que mencionar que un reciente estudio (227) indica que el mecanismo de resistencia por bombas de expulsión no es una causa común de alto nivel de resistencia a quinolonas, si bien podría facilitar las mutaciones en las dianas de las quinolonas, ya que permitiría la supervivencia bacteriana a corto plazo. Así, el alto nivel de resistencia a fluorquinolonas en *S. pneumoniae* se sugiere que viene dado por un primer paso

de mutaciones en los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV y posteriormente mutaciones en el gen *gyrA* (227).

VI. Conclusiones

Una vez evaluados los resultados podemos extraer de este trabajo las siguientes conclusiones:

1.- Gemifloxacino puede ser una alternativa a las terapias clásicas en el tratamiento de cepas multirresistentes de *S. pneumoniae*, incluso con alta resistencia a ciprofloxacino.

2.- Se han encontrado diferencias en los niveles alcanzados por gemifloxacino y trovafloxacino en el bioensayo y el HPLC. Dichas diferencias parecen deberse a variaciones metodológicas en el cálculo de los parámetros más que a la presencia de metabolitos activos, siendo en nuestro caso el bioensayo un método más aproximado a lo que ocurre en el organismo.

3.- Mediante la utilización parámetros farmacodinámicos, tanto gemifloxacino como trovafloxacino mostraron buenos índices de predicción de eficacia clínica en infecciones causadas por *S. pneumoniae*, siendo gemifloxacino una mejor opción para el tratamiento de infecciones producidas por *S. pneumoniae* con alta resistencia a ciprofloxacino.

4.- El área bajo la curva de los títulos bactericidas (AUBC) parece ser un índice más sensible de los efectos farmacodinámicos que el AUC, pero son necesarios estudios clínicos para poder confirmarlo.

5.- La adición de células PMN no incrementó la tasas de muerte de ninguna de las dos quinolonas.

6.- Las dos quinolonas fueron capaces de inducir un EPA significativo (>0,5 horas) en las dos cepas ensayadas a todas las concentraciones, salvo a la concentración de 1 x CMI en la cepa resistente.

7.- El efecto del suero sobre gemifloxacino y trovafloxacino se traduce en una reducción de la actividad de estos antimicrobianos y en un aumento de cepas resistentes. Debido a esto se podría producir una errónea clasificación de las cepas en las diferentes categorías de sensibilidad.

8.- La aparición de neumococos resistentes a ciprofloxacino parece deberse a mutaciones independientes en la población que han sido seleccionadas por los fármacos, presumiblemente durante el tratamiento con estos antimicrobianos.

9.- Cerca del 30% de los neumococos resistentes a ciprofloxacino pertenecen a dos clones internacionales multirresistentes ampliamente extendidos: el clon France^{9V}-3 y el Spain^{23F}-1. La asociación de la resistencia a ciprofloxacino con estos clones epidémicos internacionales podría garantizar la rápida diseminación geográfica de la resistencia a fluorquinolonas a través de la comunidad, tanto en España como en otros países.

10.- La amplificación en el número de copias en el cromosoma del gen *pmrA* no parece contribuir a aumentar la resistencia a ciprofloxacino.

VII. Bibliografía

- 1.-Weichselbaum, A. 1886. Ueber die actiologie der acuten lungen und rippenfellentzündungen. Med Jalirbücher: 483.
- 2.-Sternberg, CM. 1897. The etiology of croupous pneumonia. Natl Med Rev. 7: 175-177.
- 3.- Bracco, RM, Kraus, MR, Roe, AS, MacLeod, CM. 1957. Transformation reactions between pneumococcus and three strains of streptococci. J Exp Med. 106: 247-259.
- 4.- Austrian, R, Buettger, C, Dole, M, 1972. Problems in the classification and pathogenic role of alpha and non hemolytic streptococci of the human respiratory tract. En: Wannamaker, L.W, Matson, J.M. eds. Streptococci and streptococcal diseases. Academic Press Inc, N.Y.: 355-370.,
- 5.- Deibel, RH, Seeley, HW. 1986. Family Streptococcaceae. En: Bergey's Manual of determinative bacteriology (8^a ed). Williams and Wilkins Company, Baltimore. 490-500.
- 6.- White, B. 1938. The biology of pneumococcus, The Commonwealth Fund., N.Y.: 33-35.
- 7.- Neufeld, F. 1990. Weber eine spezifische bakteriolytische Wirkung der Galle. Z Hyg Infectionskr. 34:454-464.
- 8.- Bowers, EF, Jeffries, LR. 1955. Optochin in the identification of *S. pneumoniae*. J Clin Pathol. 8: 58-60.
- 9.- Neufeld, F. 1902. Ueber die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. Z Hyg Infectionskr. 40: 54-72.
- 10.- Mosser, JL, Tomasz, A. 1970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. J Biol Chem. 245: 287-292.
- 11.- Henrichsen J. 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 33:2759-2762.

-
- 12.- Gasc, AM, Giammarinaro, P, Ton-Hoang, B, Geslin, P Van der Giezen, M, Sicard, M. 2000. Structural organization of the *Streptococcus pneumoniae* chromosome and relatedness of penicillin-sensitive and -resistant strains in type 9V. En: Tomasz, A. *Streptococcus pneumoniae*. Ed. Mary Ann Liebert, Inc. New York.:25-32.
- 13.- Sorensen. UBS, Agger, R, Bennedsen, J, Henrichsen, J. 1984. Phosphorylcholine determinants in six pneumococcal capsular polysaccharides detected by monoclonal antibody. *Infect Immun.* 43:876-878
- 14.- Van Dam, JEG, Flier, A., Snippe, H. 1990. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Leeuwenhoek.* 58:1-47.
- 15.- Briles, DE, Crain, MJ, Gray, BM, Forman, C, Yother, J. 1992. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 60:111-116.
- 16.- Azoulay-Dupuis, E, Rieux, V, Muffat-Joly, M, Bédos, JP, Vallée, E, Rivier, C, Isturiz, R, Carbon, C, Moine, P. 2000. Relationship between capsular type, penicillin susceptibility, and virulence of human *Streptococcus pneumoniae* isolates in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1575-1577.
- 17.- Lacks, S, Neuberger, M. 1975. Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *S. pneumoniae*. *J Bacteriol.* 124:1321-1329.
- 18.- Horne, D., Plotch, S., Tomasz, A. 1974. Cell surface components implicated as attachment sites for the pneumococcal competence activator. En: Portoles, A. (Ed.). *Bacterial transformation and transfection: Proceedings of the 3rd european meetings on genetic transformation*, North Holland, Amsterdam. 11-34.

-
- 19.-Williamson, R., Hakenbecky, R., Tomasz, A. 1980. The penicillin binding proteins of *S. pneumoniae* grown under lysis permissive and lysis protective (tolerant) conditions. F.E.M.S. Microbial Letters.7:127-131..
- 20.- Briles, EB, Tomasz, A. 1973. Pneumococcal Forssman antigen, a choline-containing lipoteichoic acid. J Biol Chem. 248: 6394-6397.
- 21.- Holtje, JV, Tomasz, A. 1975. Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus Proc Nat Acad Sci. 72:1690-1694.
- 22.- Kaplan, MH, Volanakis, JE. 1974. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system 1. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. J Immunol. 112: 2135-2147.
- 23.- Cleveland, RF, Holtje, JV, Wicken, M, Tomasz, A, Daneo-Moore, L, Shocknan, GD.1975. Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem Biophys Res Comm. 67:1128-1135.
- 24.- Andersson, F. *et al.* 1981. Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia or meningitis from healthy carriers Infect Immun. 32:311-317.
- 25.- Paton, JC, Andrew, PW, Boulnois, GJ, Mitchell, TJ. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococci proteins. Annu Rev Microbiol. 47:89-115.
- 26.- Giebink, GS, Verhoef, J, Peterson, PK, Quie, PG. 1977 Opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* types VI, XVIII, XXIII, and XXV. Infect Immun. 18:291-297

-
- 27.- Angel, CS, Ruzek, M, Hostetter, MK. 1994. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis. 158:559-570
- 28.- Chudwin, DS, Artrip, SG, Korenblit, A, Schiffman, G, Rao, S. 1985. Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 50:213-217.
- 29.- Winkelstein, JA. 1981. The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. Rev Infect Dis. 3:289-298
- 30.- Horwitz, MA. 1982. Phagocytosis of microorganisms. Rev Infect Dis, 4:104-123.
- 31.- Johnson, IB, Jr . 1981. The host response to invasion by *Streptococcus pneumoniae*: protection and the pathogenesis of tissue damage. Rev Infect Dis. 3: 282-288.
- 32.- Lalitha, MK, Thomas, K, Satish Kumar, R, Steinhoff, MC and the IBIS study group. 1999. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by coagglutination with 12 pooled antisera. J Clin Microbiol. 37:263-265.
- 33.- Fenoll, A, Jado, I, Vicioso, D, Casal, J. 1997. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. J Clin Microbiol. 35:764-766.
- 34.- Lund, E, Henrichsen, J. 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. En: Norris, E, Ribbon, F. Methods in microbiology. 12:242-261.
- 35.- Andersson, B, Dahmen, J, Frejd, T, Leffer, H, Magnusson, G, Noori, G, Eden, CS. 1983. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. J Exp Med. 158:559-570.
- 36.- Johnson, IB, Jr . 1991. Pathogenesis of pneumococcal pneumoniae. Rev Infect Dis. 13(Suppl. 6):S509-517.
- 37.- Musher, DM. 1992. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clin Infect Dis. 14:801-809.

-
- 38.- Mckee, CM, Houck, CL. 1943. Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci and streptococci. Proc Soc Exp Biol Med. 53:33-34.
- 39.-Eriksen, KR. 1945. Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type 1. Acta Pathol Microbiol Scand. 22: 398-401.
- 40.- Hansman, D, Bullen, MM. 1967. A resistant pneumococcus. Lancet. 2: 264-265.
- 41.-Hansman, D, Glasgow, H, Sturt, J, Devitt, L, Douglas, R. 1971. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. N Eng J Med. 284:175-177.
- 42.- Hansman, D, Devitt, L., Miles, H Riley, I. 1974. Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. Med J Aust. 2: 353-356
- 43.- Gratten, M, Naraqi, S, Hansman, D. 1980. High prevalence of penicillin-insensitive pneumococci in Port Moresby, Papua New Guinea. Lancet. 2:192-195.
- 44.- Naraqi, S, Kirkpatrick, GP, Kabins, S. 1974. Relapsing pneumococcal meningitis. Isolation of an organism with decreased susceptibility to penicillin G. J Pediatr. 85:671-673.
- 45.- Appelbaum, PC, Bhamjee, A, Scragg, JN, Hallett, AF, Bowen, AA, Cooper, R. 1977. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. Lancet. 2:995-997.
- 46.- Appelbaum, PC .1987. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. Eur J Clin Microbiol. 6: 367-377.
- 47.-Baquero, F, Martínez-Beltran, J, Loza, E. 1991. A review of antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J Antimicrob Chemother. 28 (Suppl C): 31-38.
- 48.- Liñares, J, Pallares, R, Alonso, T, Pérez, JL, Ayats, J, Gudiol, F, Viladrich, PF, Martin, R. 1992. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990) Clin Infect Dis.15: 99-105.

-
- 49.- Klugman, KP. 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microb Rev.* 3 (2):171-96.
- 50.- Muñoz, R, Coffey, TJ, Daniels, M, Dowson, CG, Laible, O, Casal, J., Hakenbeck, R, Jacobs, M, Musser, JM, Spratt, BG, Tomasz, A. 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.*164:302-6.
51. Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo, and D. E. Low. 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N. Engl. J. Med.* 341(4):233-9.
- 52.- Eskola, J, Anttila, M. 1999. Pneumococcal conjugates vaccines. *Pediatr Infect Dis.* 18:628-632.
- 53.- Leshner, G. Y., Froelich, F. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., Brundage, R.P. 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives, a new class of chemotherapy agents. *J. Med Chem.* 5:1063-1067.
- 54.- Crump, B., Wise, R., Dent, J. 1983. Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 24: 784-786.
- 55.- Shimizu, M., Takase, Y., Nakamura, S. 1975. Pipedemic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: *In vitro* properties. *Antimicrob Agents Chemother.* 8:132-138.
- 56.- Ito, A., Hirai, K., Inoue, M. 1980. *In vitro* bactericidal activity of Am 715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob Agents Chemother.*17:103-108.
- 57.- Smith, J. T. Chemistry and mode of action of 4-quinolone agents. 1983. Arbeitstay der Sektion. Antimikrobielle Chemotherapie der Paul-Erlich-Gesellschaft für Chemotherapie e V, Munich.
- 58.- Crumplin, G. C. 1988. Aspects of chemistry in the development of the 4-quinolone antibacterial agents. *Rev Infect Dis.* 10: 2-9.

-
- 59.-Chu, D. T. W., Fernandes, P. B. 1989. Structure-activity relationships of the fluorquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 681-684.
- 60.-Wolfson, J. S., Hooper, D. C. 1989. Fluorquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2 :376-424.
- 61.-King, DE, Malone, R, Lilley, SH. 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Phys.* 61:2741-2748.
- 62.- Ball, P. 2001. Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J Antimicrob Chemother.* 46(T1):17-24.
- 63.- Sugino, A., Peebles, C. L., Kreucer, K. N., Cozzarelli, N. R. 1977. Mechanisms of action of nalidixic acid: purification of *E. coli* nal A gene product and its relationship of DNA gyrase and another nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 74: 4767-4771.
- 64.- Gootz, T. D., Brighty, K. E. 1996. Fluorquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance and clinical aspects. *Medicinal Research Reviews.* 16: 433-486.
- 65.- Chapman, J., Georgopapadakou, N.H. 1988. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 4:438-442.
- 66.- Hancock, R., Raffle, V., Nicas, T. 1981. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 19:777-785.
- 67.- Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamayoshi, M., Nakamura, S.1986. Nalidixic acid resistant mutations of the gyrB of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1986; 204: 367-373.
- 68.- Smith, J. T. 1984. Awaking the slumbering potential of the 4-quinolone antibiotics. *Pharm J.* 233: 299-305.
- 69.- Hooper, D. C., Wolfson, J. S.1991. Mode of action of the new quinolone: new data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 4 :223-231.

-
- 70.- García Sánchez, J. E., García Sánchez, E. 1996. Antimicrobianos, desinfectantes y antibióticos. En: García-Rodríguez, J. A., Picazo, J. J. Microbiología médica. 1996. Ed: Mosby, 73-91.
- 71.- Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N.I. 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials. *Biochemistry*. 28: 2886-2894.
- 72.- Kato, J. I., Nishimura, Y., Imanura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H. 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*. 63: 393-404.
- 73.- Muñoz, R., De la Campa, A. G. 1996. ParC subunits of DNA topoisomerasa IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluorquinolone and cooperates with DNA gyrase A subunits in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 40: 2252-2257.
- 74.- Morresey, I and George, J. 1999. Activities of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases purified as recombinant proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 43:2579-2585.
- 75.- Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., Jimenez de Anta, M. T. 1996. Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 40: 491-493.
- 76.- Wiedemann, B., Heisig, P. Mechanisms of quinolone resistance. *Infection* 1994; 22, suppl 2: S73-S79.
- 77.- Tankovic, J., Perichon, B., Duval, J., Courvalin, P. 1996. Contribution of mutation in *gyrA* and *parC* genes to fluorquinolones resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 40: 2505-2510.

- 78.- Legakis, NJ, Tzouveleakis, LS, Makris, A, Kotsifaki, H. 1989. Outer membrane alterations in multiresistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* selected by ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 33: 124-127).
- 79.- Pages, JM, Bolla, JM, Bernadec, A, Fourel, D. 1990. Immunological approach of assembly and topology of OmpF, an outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Biochimie.*72:169-176.
- 80.- Jones, RN. 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest.* 119(2 Suppl):397S-404S.
- 81.- Gotoh, N. 2001. Antibiotic resistance caused by membrane impermeability and multidrug efflux systems. *Nippon Rinsho.*59:712-8
- 82.- Kaatz, GW, Seo, SM, Ruble, CA. 1993. Eflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1086-1094.
- 83.- Gill, M. J., N. P. Brenwald, and R. Wise. 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(1):187-189.
- 84.- Blaser, J., Dudley, M.N., Gilbert, D., Zinner, S. H. 1986. Influence of medium and method on the *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria to ciprofloxacin and enoxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 29: 927-929
- 85.- Smith, J. T., Lewin, C. S.1989. Quimica y mecanismo de acción de los antibacterianos quinolonas. En: Andriole, V. T.(Ed.). *Las Quinolonas*. Academic Press Limited, London. 25-90.
- 86.- Smith, J. T., Ratchiff, N. T. 1986. Einfluss von pH und magnesium auf die antibakterielle aktivitat von chinolon-preparaten. *Infection.* 14: 31-35.
- 87.- Brighty, K. E., Gootz, T. D. 1997. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 39(suppl B): 1-14.

-
- 88.- García-Rodríguez, J. A. 1997. Quinolonas de tercera generación: una nueva oportunidad terapéutica. *Rev Esp Quimioterap.* 10 (suppl 1): 1-2.
- 89.- Neu, H. C., Chin, N. 1984. In vitro activity of the new fluoroquinolone CP-99,219. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 2615-2622.
- 90.- Gómez-Lus, M. L., Pérez Balcabao, I., Prieto, J. 1997. Trovafloxacin frente a *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina. *Rev Esp Quimioter.* 10 (suppl 1): 15-19.
- 91.- Sefton, A. M., Maskell, J. P., Rafay, A. M. Whiley, A., Williams, J. D. 1997. The in vitro activity of trovafloxacin, a new fluoroquinolone, against Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 39 (suppl B): 57-62.
- 92.- Spangler, S. K., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C. 1994. Activity of CP-99,219 compared with those of ciprofloxacin, grepafloxacin, metronidazole, cefoxitin, piperacillin-tazobactam against 489 anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 2471-2476.
- 93.- Bowker, K. E., Wootton, M., Holt, H. A., Reeves, D. S., MacGovan, A. P. 1996. The in vitro activity of trovafloxacin and nine other antimicrobials against 413 anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 38: 271-281.
- 94.- García de Lomas, J., Millás, E. 1997. Actividad in vitro de trovafloxacin y otras quinolonas frente a patógenos respiratorios. *Rev Esp Quimioter.* 10 (suppl 1): 3-7.
- 95.- Edelstein, P., Edelstein, M. Ren, J., Polzer, R. 1996. Activity of trovafloxacin against *Legionella pneumophila* isolates: in vitro activity, intracellular accumulation and killing in macrophages, and pharmacokinetics and treatment of Guinea pigs with *L. pneumophila* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 314-319.

-
- 96.- Kenny, G. E., Cartwright, F. D. 1996. Susceptibilities of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* to a new quinolone, trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 1048-1049.
- 97.- Khan, A., Slifer, T., Araujo, F., Remington, J. 1996. Trovafloxacin is active against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 1855-1859.
- 98.- Vincent, J., Venitz, J., Teng, R., Barris, B. A., Willavize, S. A., Polzez, R. J., Friedman, H. L. 1997. Pharmacokinetics and safety of trovafloxacin in healthy male volunteers following administration of single intravenous of the prodrug, alatrofloxacin. *J. Antimicrob Chemother.* 39 (suppl B): 75-80.
- 99.- Teng, R., Harris, S. C., Nix, D.e., Schentag, J. J., Foluds, G., Liston, T. E. 1995. Pharmacokinetics and safety of trovafloxacin, a new quinolone antibiotic, following administration of single oral doses to healthy male volunteers. *J. Antimicrob Chemother.* 36: 385-394.
- 100.- Teng, R., Liston, T. E., Harris, S. C. 1996. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of trovafloxacin in healthy male volunteers. *J Antimicrob Chemother.* 37: 955-963.
- 101.- Teng, R, Dogolo, L. C., Willavize, S. A., Vincent, J. 1995. Effect of food on the bioavailability of CP-29,219, a new fluoroquinolone antibiotic in healthy male volunteers. *Can J Infect Dis.* 6 (suppl C): Abstract 4601.
- 102.- Teng, R, Dogolo, L. C, Vincent, J. 1996. Food does not affect the bioavailability of trovafloxacin tablets. 2nd International Symposium on Infection Models in Antimicrobial Chemotherapy .Abstract 47:458.
- 103.- Perea, J.R., García, E., Sádaba, B., López de Ocariz, A. 1997. Farmacocinética de trovafloxacino. Significación Clínica. *Drugs of Today.* 33 (suppl 7),33-42.

-
- 104.-Drusano, G. L., Plaisance, K. L., Forrest, A., Standford, M. C. 1986. Dose ranging study and constant infusion evaluation of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 30: 444-446.
- 105.- Dan, M., Verbin, N., Gorea, A. Nagar, H., Berger, S.A. 1987. Concentration of ciprofloxacin in human liver, gallbladder and bile after oral administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 32: 217-218.
- 106.- Cutler, N.R., Teng, R.,Dogolo, L. C. 1996. Penetration of trovafloxacin into CSF in healthy subjects following intravenous administration of alatroflxacin. *Proceedings of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nueva Orleans; Abstract.B1548:345.*
- 107.- Fitton, A. 1992. The quinolones and overview of their pharmacology. *Clin Pharmacokinet.* 22 (suppl 1): 1-11.
- 108.-Frías Iniesta, J. 1997. Farmacocinética de trovafloxacino y su significación clínica. *Rev Esp Quimioter.*10 (suppl 1): 21-27.
- 109.- Lebel , M., Teng, R., Dogolo,, L. C. 1996. The effect of steady.state trovafloxacin on the steady-state pharmacokinetics of caffeine in healthy subjects. *Proceedings of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nueva Orleans; Abstract.F2569:266.*
- 110.- Giner Almaraz, S., Canós, M., Gobernado, M. 1996. Actualidad de las quinolonas. *Rev Esp Quimioter.* 9: 25-38.
- 111.- Vincent, J., Teng, R., Dogolo,, L. C. 1995. Effect of steady.state trovafloxacin on the pharmacokinetics os single and multiple doses of theophilline in healthy male volunteers. In *Abstract of the 35th 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 1995. Abstract F2239:155.*

-
- 112.- Purkins L, Oliver SD, Willavize SA. 1998. An open, controlled, crossover study on the effects of cimetidine on the steady-state pharmacokinetics of trovafloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ; 7: 431-3.
- 113.- Teng, R., Liston, T. E., Harris, S. C. 1996. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of trovafloxacin in healthy male volunteers. *J Antimicrob Chemother.* 37: 955-963.
- 114.- Ball, P, Mandell, L, Niki, Y, Tillotson, G. 1999. Comparative tolerability of the newer fluoroquinolones. *Drug Saf.* 21:407-421.
- 115.- Mayne, J. T., Johnson, N. J. , Kluwe, W. N., Lencoski, D. L. Polzer, R. J. 1997. A study of the phototoxic potential of trovafloxacin in BALB/c mice. *J Antimicrob Chemother.*39, suppl B, 67-73.
- 116.-Allen, A, Bygate, E, Coleman, K, McAllister, P, Teillol-Foo, M. 1999. In vitro activity and single-dose pharmacokinetics of the (+) and (-) enantiomers of gemifloxacin. Poster presented at the 21st International Congress of Chemotherapy, Birmingham, UK, 1999. Abstract P449. *J Antimicrob Chemother.* 44 (Suppl A): 139.
- 117.- Morresey, I and George, J. 2000. Purification of pneumococcal type II topoisomerases and inhibition by gemifloxacin and other quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 45: Suppl 1: 101-106.
- 118.- Cormican, MG, Jones, RN. 1997. Antimicrobial activity and spectrum of LB20304, a novel fluoronaphthyridone. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 204-211.
- 119.- Davies, TA, Kelly, LD, Pankuch, GA, Credito, KL, Jacobs, MR, Appelbaum, PC. 2000 Antipneumococcal activities of gemifloxacin compared to those of nine other agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 304-310.
- 120.- Davies, TA, Kelly, LD, Hoellman, DE, Clark, CL, Bajaksouzian, S, Jacobs, MR, Appelbaum, PC. 2000. Activities and postantibiotic effect of gemifloxacin compared to

those of 11 other agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.

Antimicrob Agents Chemother. 44: 633-639.

121.- Duffy, LB, Crabb, D, Searcey, K, Kempf MC. 2000 Comparative potency of gemifloxacin, new quinolone, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. J Antimicrob Chemother. 45, Suppl S1: 29-33.

122.- Hammerschlag, MR. 2000. Activity of gemifloxacin and other new quinolones against *Chlamydia pneumoniae*: a review. J Antimicrob Chemother. 45, Suppl S1: 35-39.

123.- Dubois, J and St-Pierre ,C. 2000. Comparative *in vitro* activity and post-antibiotic effect of gemifloxacin against *Legionella* spp. J Antimicrob Chemother. 45, Suppl S1: 41-46.

124.- Marco, F, Barrett, MS, Jones, RN. 1997. Antimicrobial activity of LB20304 a fluoronaphthyridone, tested against anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother. 40: 605-607.

125.- Allen, A, Bygate, E, Oliver, S, Johnson, M, Ward, C, Cheon, A, Choo, YS, Kim, I. 2000 Pharmacokinetics and tolerability of gemifloxacin (SB-265805) after administration of single oral doses to healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 44: 1604-1608).

126.- Allen, A, Bygate, E, Voudsen, M, Oliver, S, Johnson, M, Ward, C, Cheon, A, Choo, YS, Kim, I. 2001 Multiple dose pharmacokinetics and tolerability of gemifloxacin administered orally to healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 45: 540-545.

127.- Loden, H, Petzold.Bradley, P, Lubasch, A, Smith, A, Lewis, A, Voudsen, M. 2000. Effect of calcium carbonate on the bioavailability of gemifloxacin in healthy volunteers. Abstract 2266, 40th Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy. 360.

-
- 128.- Davy, M, Bird, N, Rost, KL, Fuder, H. 1999. Lack of effect of gemifloxacin on the steady-state pharmacodynamics of warfarina in healthy volunteers *Chemotherapy*. 45: 491-495.
- 129.- Vousden, M, Allen, , Lewis, A, Ehren, N. 1999. Lack of pharmacokinetic interaction between gemifloxacin and digoxin in healthy elderly volunteers. *Chemotherapy*. 45: 485-490.
- 130.- Allen, A Vousden, M , Lewis, A. 1999. Lack of omeprazole on the pharmacokinetic of oral gemifloxacin in healthy volunteers. *Chemotherapy*. 45: 496-503.
- 131.- Davy, M, Allen, A, Bird, N, Rost, KL, Fuder, H. 1999 Lack of effect of gemifloxacin on the steady-state pharmacodynamics of tefilina in healthy volunteers *Chemotherapy*. 45: 478-484.
- 132.- Allen, A Vousden, M , Porter, A, Lewis, A. 1999. Lack of Maalox® on the bioavailability of oral gemifloxacin in healthy volunteers. *Chemotherapy*. 45: 504-511.
- 133.- Vousden, M, Ferguson, J, Richards, J, Bird, N, Allen, A. 1999. Evaluation of phototoxic potential of gemifloxacin in healthy volunteers compared with ciprofloxacin. *Chemotherapy*. 45: 512-520.
- 134.- Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo, and D. E. Low. 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N. Engl. J. Med.* 341:233-239.
- 135.- Linares, J., A. G. de la Campa, and R. Pallares. 1999. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N. Engl. J. Med.* 341:1546-7; discussion 1547-1548.
- 136.- Garcia-Rey, C., L. Aguilar, F. Baquero, and Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. 2000. Influences of different factors on prevalence of

ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 44:3481-3482.

137.- Perez-Trallero, E., E. Bouza, J. Garcia-de-Lomas, J. A. Garcia-Rodriguez, and C. Garcia-Rey. Antimicrobial susceptibility of 1685 *Streptococcus pneumoniae* isolates from respiratory infections in Spain (1998-1999). Interscience Conference Antimicrobial Agents and Chemotherapy. abstract. 1801:112.

138.- Baranova, N. N., and A. A. Neyfakh. 1997. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:1396-1398.

139.- Munoz, R., and A. G. De La Campa. 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. Antimicrob. Agents Chemother. 40:2252-2257.

140.- Pan, X. S., and L. M. Fisher. 1996. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV - Role in fluoroquinolone resistance. J. Bacteriol. 178:4060-4069.

141.- Baquero, F., J. A. Garcia-Rodriguez, J. Garcia de Lomas, and L. Aguilar. 1999. Antimicrobial resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 43:357-359.

142.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: approved standard, 4th ed. M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

-
- 143.- Thorvilson, J., Kohner, P, Henry, N, Cockerill, F. 1997. Comparison of agar dilution, brith dilution, disk diffusion, E-test for susceptibility testing of penicillin-susceptible and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 16:391-394.
- 144.- National Committe for Clinical Laboratory Standars. Mic Testing. Supplemental tables. M100-S10 (M7) National Committe for Clinical Laboratory Standar, Wayne, Pa. 2000.
- 145.- Klassen M, Edberg SC. 1996. Measurement of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In Lorian V (ed) Antibiotics in laboratory medicine. The Williams and Wilkins Co, Baltimore : 230-295.
- 146.- Zeiler MJ, Beerman D, Wingender W, Foster D, Schaht P. 1998 Bactericidal activity of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin in serum and urine after oral administration to healthy volunteers. Infection. 16, Supplement 1:S19-S23
- 147.- Eggleton, P., Gargan, R., Fisher, D. 1989. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yields without the use of dextran gradient polymers. J Immunol Meth. 121: 105-113.
- 148.- Gargan, RA., Brumfitt, W., Hamilton-Miller, JMT. 1989. Failure of water to lyse polymorphonuclear neutrophils completely. Role of pH and implications for assessment of bacterial killing. J Immunol Methods. 124: 289-291.
- 149.- McDonald, PJ., Craig, WA., Kunin, CM. 1977. Persistant effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. J Infect Dis. 135: 217-223.
- 150.- Martínez, L. Métodos de estudio y valoración de los antimicrobianos. 1999. En: JE. García Sánchez, R. López, J. Prieto (Eds). Antimicrobianos en Medicina. Prous Science, Barcelona. 99-107.

-
- 151.- Craig, WA., Gudmundsson, S. 1996. Postantibiotic effect. En: V. Lorian MD. (Ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 296-329.
- 152.- Bundtzen, RW., Gerber, AU., Cohn, DL., Craig, WA. 1981. Postantibiotic suppression of bacterial growth. Rev Infect Dis. 3: 28-37.
- 153.- Soares, S., K. G. Kristinsson, J. M. Musser, and A. Tomasz. 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. J. Infect. Dis. 168:158-63.19.
- 154.- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-9.
- 155.- Sa-Leao, R., A. Tomasz, I. S. Sanches, S. Nunes, C. R. Alves, A. B. Avo, J. Saldanha, K. G. Kristinsson, and H. de Lencastre. 2000. Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and - resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. J. Clin. Microbiol. 38:4137-4144.
- 156.- MacGowan, AP, Wise, R. 2001 Establishing MIC breakpoints and the interpretation of the *in-vitro* susceptibility test. J Antimicrob Chemother. 48(Suppl. 1):17-28..
- 157.- Chiou WL. 1978. Critical evaluation of the potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level-time curve. J Pharmacokinetic Biopharmaceutic.6: 539-547.
- 158.- Craig, W. 1998. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 26:1-12.

- 159.- Drusano G, Standiford H, Ryan P, McNamee W, Tatem B, Schimpff S. 1986. Correlation of predicted serum bactericidal activities and values measured in volunteers. *Eur J Clin Microbiol.* 5: 88-92.
- 160.- Coffey, T. J., M. Daniels, M. C. Enright, and B. G. Spratt. 1999. Serotype 14 variants of the Spanish penicillin-resistant serotype 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinational replacements of the *cpsA-pbp1a* region. *Microbiology* 145:2023-31.
- 161.- Coffey, T. J., M. C. Enright, M. Daniels, J. K. Morona, R. Morona, W. Hryniewicz, J. C. Paton, and B. G. Spratt. 1998. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 27:73-83
- 162.- Nesin, M., M. Ramirez, and A. Tomasz. 1998. Capsular transformation of a multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae in vivo*. *J. Infect. Dis.* 177:707-13.
- 163.- Ramirez, M., and A. Tomasz. 1999. Acquisition of new capsular genes among clinical isolates of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 5:241-6.
- 164.- Pérez-Trallero, E., García-Arenzana, J.M., Jiménez, J.A., Peris, A. Therapeutical failure and selection of resistance to quinolones in a case of pneumococcal pneumonia treated with ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990; 9:905-906.
- 165.- Korner, R.J., Reeves, D.S., MacGowen. Danger of oral fluoroquinolone treatment in community acquired upper respiratory tract infections. *Brit Med J.* 1994; 308: 191-192.
- 166.- Ewig, S., Ruiz, M., Torres, A., Marco, F., Martinez, J.A., Sánchez, M., Mensa, J. 1999. Pneumonia acquired in the community through drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Resp Crit Care Med.* 159: 1835-1842.

-
- 167.- Gee, T, Andrews, JM, Ashby, JP, Marshall, G, Wise, R. 2001. Pharmacokinetics and tissue penetration of gemifloxacin following a single oral dose. *J Antimicrob Chemother.* 47: 431-434.
- 168.- Wise, R, Mortiboy, D, Child, J, Andrews, JM. 1996. Pharmacokinetics and penetration into inflammatory fluid of trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 47-49.
- 169.- Borner K, Höffken G, Lode H, Koeppe P, Prinzing C, Glatzel P, Wiley R, Olschewski P, Sievers B, Reinitz D. 1986. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration. *Eur J Clin Microbiol.* 5: 179-186
- 170.- Joos B, Ledergerber B, Flepp M, Bettex JD, Lüthy R Siegenthaler W. 1985. Comparison of high-pressure liquid chromatography and bioassay for determination of ciprofloxacin in serum and urine. *Antimicrob Agents Chemother.* 27: 353-356
- 171.- Wingender W, Graefe KH, Gau W, Förster D, Beermann D, Schacht P. 1984. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and intravenous administration in healthy volunteers. *Eur J Clin Microbiol* 3, 355-359.
- 172.- Zeiler, HJ, Petersen, U, Gau, W, Ploschke, HJ. 1987. Antibacterial activity of the metabolites of ciprofloxacin and its significance in the bioassay. *Drug Res.*37: 131-134.
- 173.- Stass, H, Dalhoff, A, Kubitza, D, Schühly, U. 1998. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:2060-2065.
- 174.- Dalvie, DK, Khosla, N, Vincent, J. 1997. Excretion and metabolism of trovafloxacin in humans. *Drug Metab Dispos.* 25:423-427.
- 175.- Turnidge, J. 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs.* 58; Suppl.:29-36.

-
- 176.- Forrest, A, Nix, DE, Ballow, CH, Goss, TF, Birmingham, MC, Schentag, JJ. 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1073-81.
- 177.- Thomas, JK, Forrest, A, Bhavnani, SM, Hyatt, JM, Cheng, A, Ballow, CH, et al. 1998. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 521-527.
- 178.- Ball, P. 1999. New fluoroquinolones: real and potential roles. *Current Infect Dis Reports.* 1:470-479.
- 179.- Marrie, TJ, Lau, CY, Wheeler, SL, Wong, CJ, Vandervoort, MK, Feagan, BG. 2000. A controlled trial of a critical pathway for treatment of community-acquired pneumonia. *J Amer Med Association.* 283: 749-755.
- 180.- Lister, PD, Sanders, CC. 1999. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 43:79-86
- 181.- Zhanel, GG, Walters, M, Laing, N, Hoban, DJ. 2001. In vitro pharmacodynamic modelling simulating free serum concentrations of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 47:435-440.
- 182.- Drusano GL. 1995 Pharmacology of anti-infective agents. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Churchill Livingstone Inc., New York 225-232.
- 183.- Fuentes F, Giménez MJ, Marco F, Alou L, Aguilar L, Prieto J. 2000. In vitro susceptibility to gemifloxacin and trovafloxacin of *Streptococcus pneumoniae* strains exhibiting decreased susceptibility to ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19, 137-139.

-
- 184.- File, TM, Schlemmer, B., Garau, J, Cupo, M, Young, C. and the 049 Clinical Study Group. 2001. Efficacy and safety of gemifloxacin in the treatment of community-acquired pneumonia: a randomized, double-blind comparison with trovafloxacin. *J Antimicrob Chemother*, 48: 67-74
- 185.- Urban, C, Arman, N, Zhao, X, Mariano, N, Segal-Maurer, S, Drlica, K. 2001 Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* associated with levofloxacin therapy. *J Infect Dis*; 184:794-798.
- 186.- Weiss, K, Restieri, C, Gauthier, R, Laverdiere, M, McGeer, A, Davidson, R, et al. 2001. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. 33:517-522.
- 187.- Israel P, Gillium JG, Turik M, Harvey K, Ford J, Dalton M, Towle M, Echols R, Heller AM, Polk R. 1993. Pharmacokinetics and serum bactericidal titres of ciprofloxacin and ofloxacin following multiple oral doses in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 37: 2193-2199.
- 188.- Amsterdam D. 1990. Assessing cidal activity of antimicrobial agents: problems and pitfalls. *Antimicrob Newslett*. 7: 49-56.
- 189.- Wolfson JS, Swartz MN. 1985. Serum bactericidal activity as a monitor of antibiotic therapy. *New Eng J Med*. 312: 968-975.
- 190.- Trautman, M, Ruhnke, M, Borner, K, Wagner J, Koeppe P. 1996. Pharmacokinetics of sparfloxacin and serum bactericidal activity against pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 40: 776-779.
- 191.- Aguilar, L, Rosendo, J, Balcabao, IP, Martín, M, Giménez, MJ, Frías, J, Prieto, J. 1997. Pharmacodynamic effects of amoxicillin versus cefotaxime against penicillin-susceptible and penicillin-resistant pneumococcal strains: a phase I study. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 1389-1391.

-
- 192.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. *Methodology for the serum bactericidal test. Approved guidelines. M21-A*. NCCLS, Villanova, Pa.
- 193.- Craig, WA, Welling, PG. 1977. Protein binding of antimicrobials: clinical pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinetics*. 2: 252-268.
- 194.- Aguilar, L, Esteban, C, Frías, J, Pérez-Balcabao, I, Carcas, AJ, Dal-Ré, R. 1994. Cefminox: correlation between in-vitro susceptibility and pharmacokinetics and serum bactericidal activity in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother*. 33: 91-101.
- 195.- Aguilar, L, Balcabao, IP, Salvá, P, Martín, M, Costa, J, Prieto, J, Dal-Ré, R. 1996. Ex vivo antibacterial properties of rifloxacin compared with those of norfloxacin in a study with healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 40: 17-21.
- 196.- Pien, FD, Williams, RD, Vosti, KL. 1975. Comparison of broth and human serum as the diluent in the serum bactericidal test. *Antimicrob Agents Chemother*. 7: 113-114.
- 197.- Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 1991. A guide to sensitivity testing. *J Antimicrob Chemother*. 27: Supplement. D.
- 198.- Kowalsky, SF, Echols, RM, McCormick, EM. 1990. Comparative serum bactericidal activity of ceftizoxime/metronidazole, ceftizoxime, clindamycin, and imipenem against obligate anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 25: 767-775.
- 199.- Guglielmo, BJ, Rodondi, LC. 1988. Comparison of antibiotic activities by using serum bactericidal activity over time. *Antimicrob Agents Chemother*. 32: 1511-1514.
- 200.- Redington, J, Craig, W, Moffatt, J. 1991. Does the area under the bactericidal curve in serum correlate with the in-vivo antimicrobial activity?, In Program and abstracts of the 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 1193, American Society for Microbiology, Washington, D.C. . 298.

-
- 201.- Joyanes, P, Pascual, A, García, I, Perea, EJ. 2000. In vitro bactericidal activity of gemifloxacin, trovafloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in the presence and absence of human neutrophils (PMN).3rd European Congress of Chemotherapy. Madrid. Abstract M119: 261.
- 202.- García, I, Pascual, A, Ballesta, S, Joyanes, P, Perea, EJ. 2000. Intracellular penetration and activity of gemifloxacin in human polymorphonuclear leucocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 44; 3193-3195.
- 203.- Pascual, A, García, I Ballesta, S, Perea, EJ. 1997. Uptake and intracellular activity of trovafloxacin in human phagocytes and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 41; 274-277.
- 204.- Cuffini, AM, Tullio, V, Bonino, A, Alloco, A, Palarchio, AI, Carlone, N. 1998. Entry of sanfetrinem into human polymorphonuclear granulocytes and its cell-associated activity against intracellular, penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:1745-1750.
- 205.- Martin, M Gómez-Lus, Aguilar, L, Martinez, P, Giménez, MJ, Prieto, J. 1997. Effect of clavulanic acid and/or polymorphonuclear neutrophils on amoxicillin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis.* 16. 512-516.
- 206.- Cuffini, AM, Tullio, V, Palarchio, AI, Bonino, A, Paizis, G, Carlone, N. 1998. Enhanced effects of amoxicillin/clavulanic acid compared with amoxicillin and clavulanic acid alone on the susceptibility to immunodefenses of a penicillin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Drugs Exp Clin Res.* 24: 173-184.
- 207.- Moore, T, Rittenhouse, S, Coleman, K, Poupard, J. 2000. Post-antibiotic effect of gemifloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacin and levofloxacin against respiratory

-
- pathogens. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto Abstract 309: 258.
- 208.-Tessier, PR, Nightingale, CH, Nicolau, DP. 2000. Postantibiotic effect of trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid and broth culture media. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 36: 241-7.
- 209.- Pankuch, GA, Jacobs, MR, Appelbaum, PC. 1998. Postantibiotic effect of trovafloxacin against gram-positive and -negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:1503-5.
- 210.- Zhanel, GG., Hoban, DJ., Harding, GKM.1991. The postantibiotic effect: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP, The Annals of Pharmacotherapy.* 25: 153-163.
- 211.- Gould. IM., Jason, AC., Milve, K. 1989. Postantibiotic effect and bacterial killing by ciprofloxacin and imipenem alone and in combination. *Rev Infect Dis.* 11: 5957-5958.
- 212.- Odenholt-Tornquist, I., Löwdin, E., Cars, O. 1992. Postantibiotic sub-CMI effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 1852-1858.
- 213.- Fuursted, K. 1987. Postantibiotic effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 6: 271-274.
- 214.- De Nollin, S., Van Belle, H., Goosens, F., Thone, F., Borgers, M. 1977. Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1: 500-513.
- 215.- Craig, WA., Vogelman, B.1987. The postantibiotic effect. *Ann Intern Med.* 106: 900-902.

-
- 216.- Eliopoulos, G.M. 1995. In vitro activity of fluoroquinolones against gram-positive bacteria. *Drugs* 49, *Suppl. 2*, 48-57.
- 217.- Woodcock, J.M., Andrews, J.M., Boswell, F.J., Brenwald, N.P., Wise, R.. 1997. In vitro activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 101-106.
- 218.- Child, J, Andrews, F, Boswell, N, Brenwald, N, Wise, R. 1995. The in vitro activity of CP-99,219, a new naphthyridone antimicrobial agent: a comparison with fluoroquinolone agents. *J Antimicrob Chemother.* 35: 869-876.
- 219.- Balcabao, IP, Alou, L, Aguilar, L, Gómez-Lus, ML, Jiménez, MJ, Prieto, J. Influence of the decrease in ciprofloxacin susceptibility and the presence of human serum on the in vitro susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to five new quinolonas. (en prensa).
- 220.- Tomasz, A., A. Corso, E. P. Severina, G. Echaniz-Aviles, M. C. Brandileone, T. Camou, E. Castaneda, O. Figueroa, A. Rossi, and J. L. Di Fabio. 1998. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview. *Microb Drug Resist.* 4:195-207.
- 221.- Jones, M. E., D. F. Sahm, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Kohrer, and F. J. Schmitz. 2000. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:462-6.
- 222.- Ferrandiz, M. J., A. Fenoll, J. Linares, and A. G. De La Campa. 2000. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:840-7.

-
- 223.- Gill, M. J., N. P. Brenwald, and R. Wise. 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:187-9.
- 224.- Enright, M. C., A. Fenoll, D. Griffiths, and B. G. Spratt. 1999. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37:3210-6.
- 225.- Janniere, L., B. Niaudet, E. Pierre, and S. D. Ehrlich. 1985. Stable gene amplification in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Gene* 40:47-55.
- 226.- Sun, L., S. Sreedharan, K. Plummer, and L. M. Fisher. 1996. NorA plasmid resistance to fluoroquinolones: role of copy number and norA frameshift mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1665-9.
- 227.- Ho, PL, Yam, WC, Que, TL, Tsang, DNC, Seto, WH, Hg, TK, Ng, WS. 2001. Target site modifications and efflux phenotype in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from Hong Kong with reduced susceptibility to fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother.* 47: 655-658.