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

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y EFECTO
SOBRE LA FAGOCITOSIS INDUCIDOS POR
AMOXICILINA, AMOXICILINA/CLAVULANICO Y CEFOTAXIMA
FRENTE A *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*



TESIS DOCTORAL

Pedro Martínez Freijo
Madrid, Junio 1996

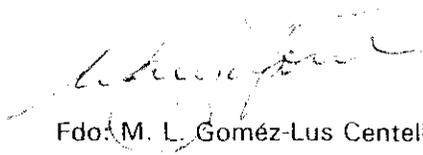
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

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

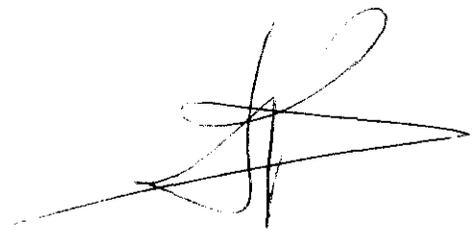
CERTIFICAN:

que el trabajo de investigación, titulado: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y EFECTO SOBRE LA FAGOCITOSIS INDUCIDOS POR AMOXICILINA, AMOXICILINA/CLAVULÁNICO, Y CEFOTAXIMA FRENTE A *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, constituye la memoria presentada por Pedro Martínez Freijo para aspirar al grado de Doctor 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 así conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Septiembre de 1996.



Fdo. M. L. Gómez-Lus Centelles



Fdo: José Prieto Prieto

A Rosaura.

A mis Padres.

Deseo expresar mi gratitud y agradecimiento:

Al Prof. Dr. José Prieto Prieto, director de este trabajo, por el interés y la ayuda mostradas, que han hecho más fácil la realización de esta tesis, así como por su experiencia y consejos válidos tanto fuera, como dentro del departamento.

A la Prof. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus, directora de ésta tesis, por el ánimo y la ayuda prestados durante su desarrollo.

A los compañeros del departamento de Microbiología por su ayuda, y en especial a los que han colaborado en la realización de esta tesis.

A Smithkline & Beecham por la colaboración prestada y el interés mostrado para que este proyecto pudiera llevarse a cabo.

A mi familia.

ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS

I INTRODUCCIÓN

1	Perspectiva histórica	3
2	Sistema inmune	9
2.1	Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos	10
2.1.1	Origen y desarrollo	10
2.1.2	Morfología	11
2.1.3	Funciones	11
2.1.3.1	Quimiotactismo	12
2.1.3.2	Adherencia	13
2.1.3.3	Fagocitosis	14
2.1.3.4	Liberación de componentes del neutrófilo	16
2.2	Complemento	16
2.2.1	Activación del complemento	17
2.2.1.1	Vía alternativa	17
2.2.1.2	Vía clásica	19
2.2.2	Consecuencias de la activación del complemento	20
3	Antibióticos	20
3.1	Características de los antibióticos betalactámicos	20
3.2	Mecanismos de resistencia	22
3.3	Amoxicilina	22
3.3.1	Estructura química	22
3.3.2	Características generales	23
3.3.3	Farmacocinética	23
3.4	Cefotaxima	23

3.4.1 Estructura química	24
3.4.2 Características generales	24
3.4.3 Farmacocinética	25
3.5 Acido clavulánico	25
3.5.1 Estructura química	25
3.5.2 Características generales	25
3.5.3 Farmacocinética	26
4 Streptococcus pneumoniae	26
5 Objetivos	28

II MATERIAL Y MÉTODO

1 Material	30
1.1 Microorganismos	30
1.2 Antimicrobianos	31
1.3 Azul tripán	31
1.4 Gelatina	31
1.5 Solución salina equilibrada de Hank	32
1.6 Solución isotónica de cloruro amónico	32
1.7 Tampón fosfato	32
1.8 Extracción, recuento y viabilidad de los leucocitos PMN	33
1.9 Obtención del suero	35
2 Metodo	35
2.1 Concentración mínima inhibitoria	35
2.2 Determinación de la CMI	35
2.3 Tratamiento de las bacterias	36
2.4 Cálculo estadístico	38

III RESULTADOS

1 Exposición de los resultados	40
2 Concentraciones mínimas inhibitorias	42
3 Estudio del efecto de los leucocitos PMN y los	

antibióticos sobre <u>Streptococcus pneumoniae</u>	42
3.1 Estudio del serotipo 3 de <u>S. pneumoniae</u>	42
3.1.1 Efecto de los PMN	42
3.1.2 Efecto de amoxicilina	42
3.1.3 Efecto conjunto de amoxicilina y PMN	43
3.1.4 Efecto de amoxicilina / ácido clavulánico	43
3.1.5 Efecto conjunto de amoxicilina / clavulánico y PMN	44
3.1.6 Efecto de cefotaxima	45
3.1.7 Efecto de cefotaxima y PMN	45
3.2 Estudio del serotipo 6 de <u>S. pneumoniae</u>	45
3.2.1 Efecto de los PMN	45
3.2.2 Efecto de amoxicilina	46
3.2.3 Efecto de amoxicilina y PMN	46
3.2.4 Efecto de amoxicilina / clavulánico	47
3.2.5 Efecto de amoxicilina / clavulánico y PMN	47
3.2.6 Efecto de cefotaxima	47
3.2.7 Efecto de cefotaxima y PMN	48
3.3 Estudio del serotipo 9 de <u>S. pneumoniae</u>	48
3.3.1 Efecto de los PMN	48
3.3.2 Efecto de amoxicilina	48
3.3.3 Efecto de amoxicilina y PMN	49
3.3.4 Efecto de amoxicilina / clavulánico	49
3.3.5 Efecto de amoxicilina / clavulánico y PMN	49
3.3.6 Efecto de cefotaxima	50
3.3.7 Efecto de cefotaxima y PMN	51

IV TABLAS Y GRAFICAS

V DISCUSIÓN

1 Análisis del método utilizado	85
1.1 Obtención y medición del inóculo	85

1.2 Extracción de los neutrófilos	85
1.3 Tratamiento antimicrobiano	86
1.4 Lisis de los neutrófilos	87
2 Estudio de los resultados	88
2.1 Análisis de la CMI	88
2.2 Efecto bactericida de los PMN	90
2.3 Efecto del tratamiento antibiótico	92
2.3.1 Estudio del serotipo 3	92
2.3.1.1 Tratamiento con amoxicilina	92
2.3.1.2 Tratamiento con amoxicilina/clavulánico	93
2.3.1.3 Tratamiento con cefotaxima	94
2.3.2 Estudio del serotipo 6	96
2.3.2.1 Tratamiento con amoxicilina	96
2.3.2.2 Tratamiento con amoxicilina/clavulánico	97
2.3.2.3 Tratamiento con cefotaxima	98
2.3.3 Estudio del serotipo 9	99
2.3.3.1 Tratamiento con amoxicilina	99
2.3.3.2 Tratamiento con amoxicilina/clavulánico	99
2.3.3.3 Tratamiento con cefotaxima	100
2.4 Efecto conjunto de PMN y antimicrobianos	100
2.4.1 Serotipo 3	100
2.4.2 Serotipo 6	104
2.4.3 Serotipo 9	106
2.5 Estudio del sinergismo	109

VI CONCLUSIONES

VII BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CSF	Factor estimulador de colonias
DE	Desviación estandar
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
Ig	Inmunoglobulina
NCCLS	Normas de la sociedad americana para la estandarización de métodos en laboratorios clínicos
PAE	Efecto postantibiótico
PALE	Efecto leucocitario postantibiótico
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina
PMN	Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos
UFC	Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

A Rosaura.

A mis Padres.

1 PERSPECTIVA HISTÓRICA.

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 presentaban estas moléculas sobre los patógenos, con el efecto terapéutico real, esto es, con la capacidad que presentaba dicho fármaco 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 antimicrobiano 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 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 evaluación "in vitro" de la eficacia terapéutica de los antimicrobianos necesita de mejores criterios que exclusivamente los definidos como concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. 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. McDonald y cols. (1) y Bundtzen y cols. (2) describieron un período de escaso crecimiento bacteriano tras una breve exposición de las bacterias a diferentes tipos de antibióticos empleando el término P.A.E. (Postantibiotic Effect), efecto que ya había sido introducido anteriormente por Eagle y cols. con preexposiciones bacterianas a penicilina. Actualmente el P.A.E. ha sido hallado en varias clases de antibióticos y su estudio se aplica prácticamente a todos los nuevos antimicrobianos que aparecen. Con estos estudios se trata de examinar que es lo que ocurre cuando los microorganismos dejan de tener contacto con el antimicrobiano, es decir, como se recuperan después del tratamiento antibiótico. Este efecto también se produce en condiciones fisiológicas cuando se deja de administrar un determinado antibiótico y debido a los mecanismos de lavado del organismo se van reduciendo progresivamente sus niveles en suero.

Además como ya quedaba demostrado, debido al efecto postantibiótico que conferían algunos antibióticos, la concentración de estos no tenía que ser superior a la CMI en el suero durante largos períodos de tiempo, como ocurría en la mayoría de los regímenes de dosificación de los antibióticos empleados normalmente (3), puesto que el P.A.E. provocaba una fase de latencia en el crecimiento bacteriano después de que el antibiótico hubiera desaparecido. En función de esto se podrían espaciar las dosis adecuándolas a un intervalo óptimo para cada fármaco, estableciendo así terapias discontinuas eficaces.

De esta forma, se observa que cuando trabajamos con antibióticos existe un efecto P.A.E. que confiere una ventaja al huésped. De todos modos, es improbable que esta sea la única explicación para el éxito de una terapia antibiótica discontinua. Según Weinstein y Dalton (4) la efectividad terapéutica de un antibiótico dependía también de los mecanismos de defensa del huésped. Esta era una idea que estaba olvidada hasta hace pocos años,

el sistema de defensas del organismo parecía tener un papel de escasa importancia en comparación con las terapias antibacterianas, hasta tal punto que se creía que las enfermedades infecciosas podrían ser completamente eliminadas debido, sobre todo, a la acción de estos agentes (5).

En un proceso infeccioso que tiene lugar en el organismo intervienen, efectivamente, además de los dos factores en los que nos hemos centrado hasta ahora un tercero, que hace variar la eficacia del antibiótico, es el sistema inmune del huésped. Entre estos tres factores se establecen una serie de interacciones, que se observan en el Triángulo de Davis y cols (6), y que son responsables de la mayor o menor eficacia del tratamiento quimioterápico.



Triángulo de Davis.

Por supuesto este sistema no es cerrado y se producen una serie de interacciones con otros factores (7), por ejemplo, sobre el sistema inmune actúan el sistema hormonal y a través de éste también el sistema nervioso,

o se ve afectado por estímulos externos tales como el estrés, la nutrición, etc. Los agentes antibacterianos también actúan sobre los sistemas generadores de colonias (sistema hematopoyético) y también podrían alterar el sistema neuroendocrino y los genes que controlan a este (7).

Desde que se conoció que el sistema inmune era el responsable natural de las defensas contra los microorganismos invasores, muchos autores han tratado de estudiar su posible alteración por los agentes antibacterianos. Actualmente se sabe que algunos antibióticos pueden actuar además como inmunoestimuladores, aumentando la respuesta inmune del organismo. Estos antibióticos serán en un futuro los más utilizados y de hecho ya se está estudiando la utilización de determinados antibióticos conjuntamente con algunos factores estimuladores de las colonias de granulocitos y monocitos.

Uno de los primeros en estudiar el efecto del sistema inmune en la eliminación de bacterias, después de la interacción de estas con penicilina fueron Rammelkamp y Keefer (8). Posteriormente muchos grupos observaron "in vitro" que los leucocitos producían un aumento de la eliminación bacteriana tras un pretratamiento de las bacterias con niveles suprainhibitorios de antibiótico (9,10).

De igual forma que las bacterias sufrían un retraso en el crecimiento después de una exposición a algunos antibióticos, McDonald y cols (10,11) y Pruul y cols. (12-15), demostraron que microorganismos en fase postantibiotica son más sensibles a la fagocitosis y muerte por leucocitos humanos y llamaron a este fenómeno efecto P.A.L.E. (Postantibiotic Leukocyte Enhancement).

En los últimos años se han publicado numerosos y muy variados estudios que tratan de conocer y profundizar en las relaciones que se establecen entre estos tres elementos que ya hemos mencionado: antibiótico, microorganismo y sistema inmune. Algunos autores se encargan de estudiar este efecto P.A.L.E. y someten a las bacterias durante un corto período de

tiempo a elevadas concentraciones de antibiótico (12) o a concentraciones de antimicrobiano inferiores a la CMI (16, 17). Otros estudian las variaciones que se producen en el efecto fagocítico y bactericida de los leucocitos cuando se les expone a un pretratamiento antibiótico y después de eliminar este incorporan los microorganismos (18), o como es el caso que nos ocupa exponemos continuamente los PMN y bacterias juntos a la acción del antimicrobiano.

La exposición "in vitro" de bacterias a concentraciones terapéuticas de antibióticos con diferentes mecanismos de acción pone de manifiesto que la estructura externa de la célula queda alterada debido a este tratamiento (19, 20), con los consiguientes cambios en sus propiedades; cambios en los antígenos de superficie (21-24), en las características de hidrofobicidad (25), en la excreción de toxinas, enzimas (26), y lipopolisacáridos (20, 27), cambios en el grosor de la pared (28, 29) y en las propiedades de adherencia (30). Obviamente estas alteraciones en la pared externa de la bacteria serán mayores si el antibiótico es un β -lactámico, puesto que actúan precisamente sobre estas estructuras.

Los mecanismos por los cuales se modula la sensibilidad a la muerte fagocítica son en parte desconocidos, y podría deberse a una mayor captura fagocítica. En este sentido, Pruul y cols. (31) descubrieron que un aumento en la muerte de estreptococos del grupo A por leucocitos, después de una exposición a eritromicina era dependiente de la captura fagocítica. También podría deberse a un incremento en la muerte celular una vez que la bacteria ha sido ingerida por el leucocito (13). Seguramente estos mecanismos variarán dependiendo de la bacteria y del antibiótico en cuestión.

La interacción entre neutrófilos y bacterias va a marcar el equilibrio entre el estado de enfermedad y salud y esto se ha demostrado porque muchas infecciones ocurren en períodos de neutropenia profunda y algunas infecciones crónicas tienen lugar en enfermos con defectos congénitos en las

funciones de los neutrófilos, en los cuales no se produce esta interacción bacteria-neutrófilo. Nos interesa, por tanto, averiguar si los antibióticos actúan de forma sinérgica junto con los PMN en la eliminación de las bacterias, y ver si los antibióticos favorecen la eliminación y/o unión de los PMN y las bacterias.

Por otra parte, es cierto que el máximo aumento en la actividad leucocitaria, esto es, el aumento en las funciones de los leucocitos, requiere la participación de anticuerpos y factores de complemento (10), puesto que con estos elementos del sistema inmune favorecemos una mayor interacción entre la bacteria y el fagocito, además de la propia capacidad bactericida inherente al complemento y a los anticuerpos.

Por todo ello, a través del estudio de estos factores pretendemos conseguir una mejor evaluación de la actividad de los antimicrobianos, relacionando estos con los microorganismos y con el sistema inmune, relación que se pone de manifiesto en cualquier proceso de infección bacteriana. También tratamos de obtener una mayor correlación entre los datos de estos ensayos y los que se obtienen "in vivo" para determinar, en lo posible, intervalos seguros y eficaces en la administración de antibióticos.

En este trabajo nos centraremos en estudiar las relaciones que se establecen entre los leucocitos PMN del sistema inmune, dos antibióticos de probada eficacia como son cefotaxima y amoxicilina (también compararemos los resultados con diferentes concentraciones de amoxicilina-ácido clavulánico) y que operan a través del mismo mecanismo de acción, y tres cepas de una misma especie bacteriana, Streptococcus pneumoniae observando, para ello, las variaciones que se producen en su cinética de crecimiento.

A continuación mencionaremos brevemente cada una de las partes que están implicadas en este estudio y las relaciones que se establecen entre ellas.

2. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está constituido por elementos celulares en íntima relación con factores humorales, y permite al organismo reconocer ciertos elementos extraños, así como defenderse de ellos. En los mecanismos de defensa se engloban respuestas inmunes específicas e inespecíficas.

La *inmunidad inespecífica* consiste en la fagocitosis, la respuesta inflamatoria, y la lisis celular a través de la vía alternativa del complemento (en la que no intervienen anticuerpos).

En la *inmunidad específica*, el estímulo, después de interactuar con el sistema inmune, induce la síntesis de productos celulares específicos (como anticuerpos, linfocinas, etc.). En esta respuesta participan grupos especializados de linfocitos y se generará una memoria inmunológica *específica para el agente que la desencadenó*. En esta *inmunidad específica* intervienen dos tipos de efectores:

- Un producto celular específico, los anticuerpos, sintetizados por los tejidos linfoides (inmunidad humoral).
- Los linfocitos sensibilizados específicamente (inmunidad celular).

Como todos los tipos celulares de la sangre, las células del sistema inmune también proceden de células madre pluripotentes primitivas a través de dos líneas principales de diferenciación:

- La línea linfoide que dará lugar a los linfocitos
- La línea mieloide que producirá, entre otras, las células fagocíticas.

Los fagocitos se dividen en dos tipos básicos, el sistema mononuclear, constituido por los monocitos que al pasar a los tejidos se transforman en macrófagos, y el grupo de los granulocitos polimorfonucleares que constan de un núcleo polilobulado y granulaciones típicas en su citoplasma. Dentro de estos podemos diferenciar según la afinidad que presentan sus gránulos por

los colorantes ácidos o básicos, los eosinófilos, basófilos y neutrófilos. De estos tres tipos celulares el neutrófilo tiene una gran actividad fagocítica, mientras que el eosinófilo presenta mucha menor actividad.

2.1 LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS

2.1.1 Origen y desarrollo

Los neutrófilos tienen su origen en la unidad formadora de colonias granulocito-monocito (UFC-GM), que mediante la acción del factor estimulante de colonias (CSF), liberado por macrófagos y linfocitos T activados en respuesta a determinados estímulos, producen colonias mixtas de monocitos y polimorfonucleares neutrófilos.

Este sistema está regulado por un mecanismo de feed-back negativo, de forma que, factores liberados por macrófagos (prostaglandina E) y por neutrófilos (lactoferrina) inhiben la producción de CSF (32).

Los mielocitos se forman en el compartimento mitótico proliferativo de la médula ósea a partir de células pluripotentes en aproximadamente 7,5 días, pasando por una serie de estadios celulares intermedios; promieloblastos, mieloblastos, promielocitos y mielocitos. Todas estas células tienen capacidad de división. Más tarde en el compartimento no proliferativo (postmitótico) de la médula ósea se diferencian, en metamielocitos, neutrófilos segmentados incompletos, y finalmente en neutrófilos maduros que se acumulan en el compartimento de depósito medular de donde pasaran al torrente circulatorio. Los neutrófilos maduros permanecen un corto período de tiempo en la sangre, pero no todos circulan libremente ya que algunos (el 50%) quedan retenidos por los vasos sanguíneos de pequeño calibre o se adhieren a las paredes de vasos mayores. Posteriormente los leucocitos PMN pasan a los tejidos donde finalizan su ciclo vital que sólo dura unos pocos días.

2.1.2 Morfología

Los leucocitos PMN son células esferoidales de 12 - 15 μm de tamaño con un núcleo segmentado en 2 - 5 lóbulos. Contienen unos gránulos citoplasmáticos que aparecen durante su maduración. Los gránulos azurófilos o primarios aparecen en la fase temprana de la maduración y comparten muchas características con lisosomas de células de otros tejidos, son lisosomas típicos. Los gránulos secundarios o específicos aparecen en una *etapa intermedia en el desarrollo de los neutrófilos, son menores que los primarios y no son realmente lisosomas. Al ir madurando las células aumenta el número de gránulos secundarios que llegan a predominar sobre los primarios (33). El citoplasma del neutrófilo es rico en microtúbulos y microfilamentos que confieren a la célula gran movilidad (34).*

En condiciones normales los PMN representan del 60 al 70% de los glóbulos blancos presentes en la sangre periférica de un hombre adulto. Cada día entran en el torrente sanguíneo 10^{11} nuevos PMN maduros.

2.1.3 Funciones

Los neutrófilos constituyen el principal sistema de defensa del organismo ante la mayor parte de las infecciones bacterianas. Son la primera línea de defensa celular una vez que los microorganismos han atravesado la piel, además intervienen en las reacciones inflamatorias de origen no inmunológico y muestran ciertas propiedades características que les hacen ser los causantes de la producción de lesiones tisulares.

Para cumplir estas funciones los neutrófilos realizan una serie de acciones que llevan a cabo en etapas sucesivas, a veces superpuestas, estas son fundamentalmente, el quimiotactismo, la adherencia, la fagocitosis y la liberación de los componentes del neutrófilo.

Aunque la actividad microbicida del PMN es el resultado de la suma de estas fases, el neutrófilo actúa en íntima relación con el sistema humoral y

con otros procesos inmunitarios celulares, ejerciendo sus funciones en unión con anticuerpos, complemento (35) y factores quimiotácticos (36, 37). Además los PMN también pueden interactuar con unas moléculas que no pertenecen al propio organismo como son los antibióticos. En este sentido, se ha demostrado la capacidad de muchos antimicrobianos de afectar a las funciones de los PMN, como a su quimiotaxis, fagocitosis y muerte bacteriana.

2.1.3.1 Quimiotactismo

Los PMN, como otras muchas células fagocitarias, pueden migrar activamente hacia determinados tipos de estímulos que los atraen, este fenómeno se denomina quimiotactismo. A parte de otros tipos de movimientos que puede tener el PMN, el quimiotactismo supone la migración de la célula, siguiendo un gradiente ascendente de alguna sustancia quimioattractiva que es liberada en algún lugar del organismo.

Los PMN responden a diferentes tipos de estímulos quimiotácticos entre los que se encuentran, factores liberados por muchas bacterias durante su desarrollo, factores secretados por linfocitos, un factor liberado por los propios neutrófilos, y una enzima de los sistemas de coagulación y de producción de cinina, la calicreína (33). Pero el más potente estímulo quimiotáctico al que responden los PMN se encuentra en algunos elementos de estructura polisacáridica existentes en la membrana de algunas células y endotoxinas bacterianas y sobre todo a unas sustancias que se liberan al ser activado el sistema de complemento tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo, estos factores liberados son el complejo trimolecular activado C567, el C3a y el C5a que parece ser el más activo de todos (38).

Todos estos factores difunden desde su punto de producción estableciendo un gradiente de concentración. Los neutrófilos al entrar en

contacto con ellos son activados y progresan hacia la fuente del estímulo.

Los antibióticos como tetraciclinas y aminoglicósidos inhiben la respuesta quimiotáctica de los leucocitos (39), algunos macrólidos la estimulan, mientras que la clindamicina, rifampicina (40), y β -lactámicos a concentraciones terapéuticas normales no la afectan (39).

2.1.3.2 Adherencia

Se puede conseguir un contacto entre la partícula que va a ser fagocitada y el PMN de forma totalmente inespecífica, esto es, en ausencia de anticuerpos o complemento sérico, ello obedece principalmente a propiedades de la superficie de la partícula a fagocitar, como su tensión superficial o falta de afinidad por el agua. Sin embargo, la fagocitosis puede ser facilitada por distintos anticuerpos, pues las partículas cubiertas por estos son ingeridas de manera más eficaz. También el complemento puede intervenir como amplificador de este fenómeno, del que hablaremos más adelante. Este principio facilitador de la fagocitosis por los anticuerpos y el complemento se denomina opsonización y las partículas que lo realizan se denominan opsoninas.

La opsonización se encarga de que se establezca el reconocimiento y un sólido contacto con los elementos que van a ser ingeridos antes de que se produzca la verdadera ingestión. Esto es debido a que en la membrana de los fagocitos hay unos receptores específicos para el fragmento Fc, invariable, de una molécula de inmunoglobulina (Ig) y también receptores para algunos componentes del sistema de complemento.

Las Ig se unen por sus brazos Fab, variables, a los antígenos de las bacterias y el brazo Fc se une al receptor específico del fagocito.

Dentro de las Ig, la Ig G es la que mayor capacidad opsónica directa presenta. La Ig M tiene una actividad opsónica secundaria a su capacidad de activar el sistema de complemento (41).

En cuanto al complemento, se diferencian receptores específicos para C3b, C4b y C3d en la membrana del PMN (42).

La capacidad de los antimicrobianos de modificar la adherencia de los PMN por la bacteria se basa en una acción directa del antimicrobiano sobre la bacteria. Esto se produce por el debilitamiento de la estructura bacteriana y el afloramiento a la superficie de algunos antígenos que van a facilitar la opsonización y por tanto el contacto con el PMN, debido fundamentalmente a la exposición de la bacteria a los antibióticos. En este sentido podemos decir que la fagocitosis de *S. aureus* se incrementa tras la inhibición de la síntesis de proteína A, que impide la opsonización de la bacteria (43), debido a la exposición a clindamicina y ácido fusídico (23). La gentamicina aumenta la fagocitosis de algunas bacterias debido a que también incrementa su opsonización (44). El pretratamiento de *E. coli* con netilmicina también eleva el gasto de complemento a la vez que la fagocitosis (45).

2.1.3.3 Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso de ingestión de la partícula. Una vez que la *partícula ha sido adherida a la superficie del fagocito, este forma una invaginación de su membrana plasmática englobando la partícula en una vacuola fagocítica, formando así lo que se denomina un fagosoma.*

Modificaciones morfológicas que acompañan a la fagocitosis

Cuando se forma el fagosoma los gránulos citoplasmáticos unen sus membranas con las de aquel y entran en contacto los contenidos de ambas *vesículas constituyendo un fagolisosoma.*

Los gránulos (primarios) de los PMN contienen gran cantidad de enzimas hidrolíticas y otras sustancias bactericidas, de modo que cuando estas enzimas se ponen en contacto con los microorganismos ingeridos, se inicia el proceso de su destrucción. Estas enzimas hidrolíticas tienen un pH óptimo de actuación ácido, que se puede conseguir en el fagolisosoma por la

producción de ácido láctico.

Fenómenos metabólicos que acompañan a la fagocitosis: procesos antimicrobianos

Después de formarse el fagosoma se producen en la célula una serie de alteraciones en sus reacciones bioquímicas, en conjunto estos cambios se conocen como "crisis respiratoria" y comprenden: aumento de la glucólisis, aumento importante de la actividad de la vía de corto circuito de la hexosa monofosfato y un incremento del consumo de oxígeno, de producción de H_2O_2 y de ácido láctico.

Los mecanismos antimicrobianos que se desencadenan como consecuencia de la crisis respiratoria fueron agrupados por Klebanoff, dependiendo de su necesidad o no de oxígeno y se pueden observar en la siguiente tabla (46):

1. Que dependen de O_2

A. Con intervención de mieloperoxidasa (MPO)

B. Que no dependen de MPO

1. H_2O_2
2. Anión superóxido (O_2^-)
3. Radical hidroxilo (OH)
4. Oxígeno en "singlete" (O_2^*).
5. Complejo ascorbato - peróxido - ion metálico
6. Oxidación de ácido aminado

2. Que no dependen de O_2

- a. Acidez del medio
- b. Lisozima
- c. Lactoferrina
- d. Proteínas catiónicas en gránulos.

Las causas por las que los distintos antibióticos influyen en la fagocitosis y en los procesos antimicrobianos, dependen, entre otros factores,

del mecanismo de acción de cada fármaco. Los β -lactámicos tienen una escasa permeabilidad en la célula fagocítica, por lo que en general, van a afectar poco a los procesos que se producen en el interior del PMN después de que una partícula halla sido ingerida. No obstante, tenemos ejemplos en los que se ponen de manifiesto variaciones en estos efectos intracelulares. Se ha observado que cefotaxima incrementó la muerte de S. aureus opsonizado y la respuesta oxidativa de los PMN. Cefodizima aumentó la muerte intracelular de algunas bacterias, aunque en este caso se produjo por la interacción con el sistema independiente de O_2 de los PMN (47).

2.1.3.4 Liberación de componentes del neutrófilo

Durante la fagocitosis los neutrófilos van a liberar al medio componentes celulares, algunos de ellos son responsables de las lesiones que se producen en los tejidos adyacentes, como las enzimas de proteólisis (catepsina, colagenasa, elastasa) que podrían explicar las lesiones que se producen en la membrana basal y en el tejido conectivo, otros tienen actividad bactericida y aumentan la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Los neutrófilos también producen cininas, pequeños polipéptidos con propiedades vasodilatadoras, proteasas que degradan C5 liberando C5a, pirógenos endógenos que son liberados después de la fagocitosis y que pueden ser una de las causas de la fiebre y otras sustancias que producen el depósito de fibrina actuando sobre el sistema de coagulación.

Los PMN también intervienen en la producción de SRS-A (sustancia reactiva lenta de anafilaxia) que media la contracción del músculo liso, además de segregar un factor quimiotáctico para los macrófagos.

2.2 COMPLEMENTO

El sistema de complemento lo forman una serie de proteínas séricas que

reconocen determinados elementos presentes en la superficie de algunas estructuras celulares a las que se unen, favoreciendo así, los procesos de fagocitosis e incluso pueden llegar a producir la lisis de la célula por sí mismos.

Los anticuerpos actúan en íntima relación con el complemento. Son producidos por ciertas células linfoides (linfocitos B y células plasmáticas) y se encargan de neutralizar las toxinas bacterianas, potenciar la fagocitosis por opsonización de las bacterias y desencadenar la cascada del complemento.

La actividad del complemento se lleva a cabo a través de unos componentes proteicos que actúan secuencialmente, de forma que al activarse el primero de ellos, este adquiere la capacidad de activar varias moléculas del siguiente componente de la secuencia, cada uno de los cuales actúan sobre un tercero, es decir, un efecto en cascada con amplificación. Los componentes terminales de la cascada del complemento pueden causar un agujero en la membrana celular en la que estén fijados, que puede ser observado por microscopía electrónica (48).

2.2.1 Activación del complemento

El mecanismo de la activación del complemento puede ocurrir a través de dos vías diferentes, la vía clásica y la alternativa.

2.2.1.1 Vía alternativa

El C3 presente en el suero se hidroliza lenta y espontáneamente formando C3b⁽¹⁾. El C3b se une a un factor B y sobre ellos actuará una enzima produciendo la hidrólisis de B y obteniéndose C3bBb⁽²⁾ que es la enzima convertasa del C3 de la vía alternativa, denominada así porque reacciona rápidamente con el propio C3 y lo escinde en dos fragmentos C3a y C3b, este último continúa el ciclo de forma amplificada. Este ciclo no se produce constantemente en el suero, porque la convertasa del C3 (C3bBb) en solución

(1) Los productos de los factores hidrolizados se denominan a ó b.

(2) Con la línea debajo ponemos de manifiesto que el compuesto formado tiene actividad enzimática.

es inestable, además, el C3b es inactivado por un factor I (fig. 2).

Sin embargo, algunos microorganismos con unas superficies ricas en carbohidratos van a estabilizar la convertasa del C3 y también van a proteger al C3b formado. La convertasa C3bBb fijada a la membrana del microorganismo se estabiliza de forma aún más potente cuando actúa sobre ella otra enzima, la properdina.

Sobre el C3bBb, que está en la superficie de la bacteria, se une otra molécula de C3b formando un complejo C3bBb3b que se denomina convertasa del C5.

A partir de ahora al complejo formado en la membrana exterior se unen más proteínas, la siguiente es la C5, que es escindida en C5a que se libera, y C5b que se queda unida al complejo, posteriormente se unen C6 y C7, luego C8 y finalmente C9, que se inserta en la bicapa lipídica de la célula en cuestión formando un complejo de ataque a la membrana. Este es en realidad un canal que va a dejar pasar algunos iones y moléculas de agua al interior de la célula, pudiendo conducir de esta forma a su destrucción.

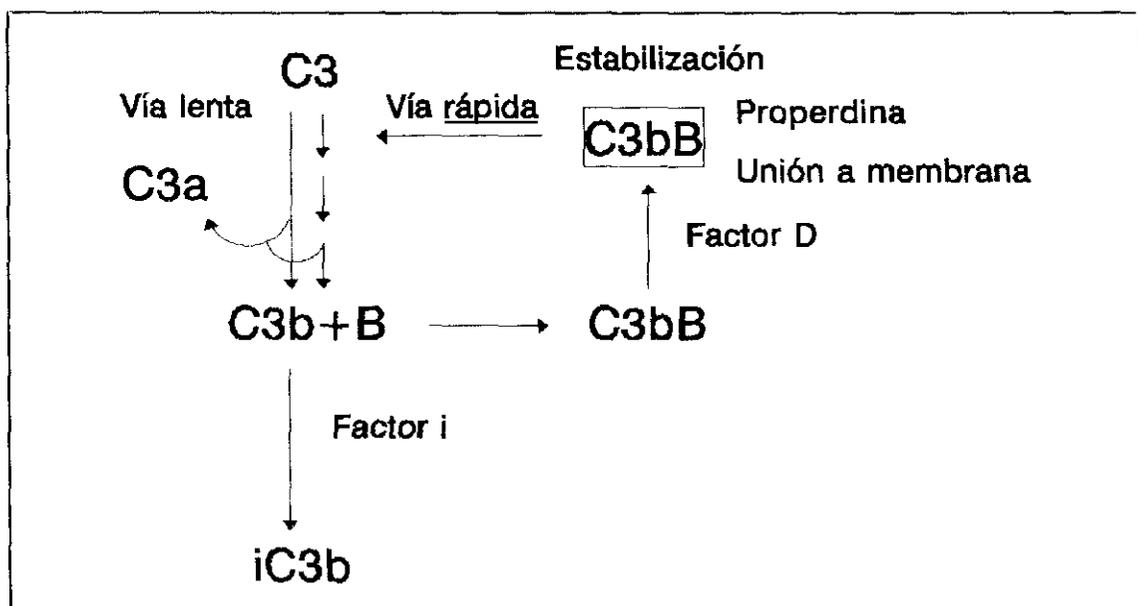


Fig. 2. Esquema de la ruta alternativa del complemento hasta la formación de la convertasa del C3, en el recuadro superior derecho.

2.2.1.2 Vía clásica

Una de las proteínas que interviene en esta ruta es la denominada C1, que consta de 3 subunidades, C1q, C1r, y C1s.

El proceso, a diferencia de lo que ocurre en la vía alternativa, requiere la participación de Ig. Cuando dos o más moléculas de anticuerpo unidas a sus respectivos antígenos se unen a la subunidad C1q la proteína sufre una alteración en su conformación, de forma que la subunidad C1s va a poder actuar sobre otra proteína sérica, la C4, escindiéndola en dos moléculas C4a y C4b. El componente C4b queda unido a la superficie celular, y es capaz de atrapar una molécula de C2 que reacciona con la subunidad C1s escindiéndose en C2a y C2b. Este último se une al complejo, obteniéndose así, la enzima C4b2b que es la convertasa C3 de la vía clásica.

El ataque de esta enzima a C3 va a proporcionarnos un fragmento C3a, que se libera de igual forma que ocurría en la vía alternativa, y un fragmento C3b que se une a C4b2b constituyendo el complejo C4b2b3b o convertasa C5 de la vía clásica que seguirá el mismo proceso que en la vía alternativa (fig. 3).

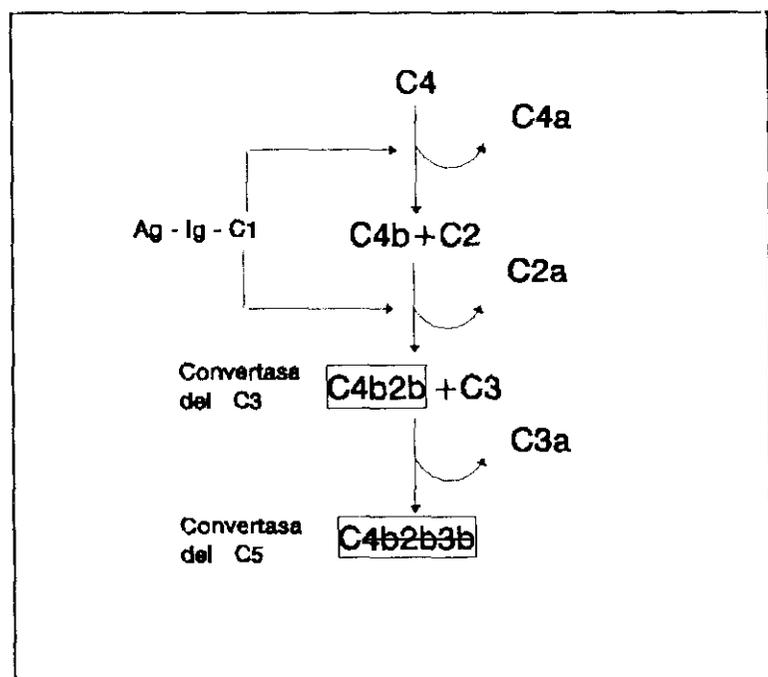


Fig. 3. Esquema de la vía clásica del complemento hasta la formación de la convertasa del C3 y del C5.

2.2.2 Consecuencias de la activación del complemento

La activación del complemento provoca la formación de muchos productos con actividad biológica, algunos de ellos se sitúan en las superficies de las partículas activadoras y pueden conducir a la lisis de las células, como en el caso del complejo C5b-9. Otros llevan a la fagocitosis como ocurre con el C3b, debido a que existen lugares de unión para esta molécula en los PMN y en otros leucocitos. Otros factores provocan una reacción inflamatoria local, principalmente el C3a y C5a, además estos, tienen propiedades anafilácticas y quimiotácticas para los PMN. Debido a estas actividades la intervención del complemento es esencial en las defensas del huésped contra las agresiones microbianas, como se pone de manifiesto en muchos estudios de fagocitosis (15, 49) donde la sensibilidad de las bacterias frente a la acción microbicida de los PMN aumenta en presencia de complemento.

Los antibióticos van a variar la relación que se establece entre la bacteria y el sistema inmune, debido al debilitamiento que provocan en la estructura bacteriana. Los β -lactámicos actúan sobre todo a nivel del peptidoglicano de la pared de la bacteria, causando variaciones en la *morfología de ésta y permitiendo que queden expuestos a la acción de los anticuerpos y del complemento algunos antígenos*. De esta forma, facilitan la activación del complemento, aumentan los contactos entre fagocitos y bacterias, e incrementan la fagocitosis.

3 ANTIBIÓTICOS

3.1 Características de los antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos tienen en su estructura un anillo betalactámico de cuatro miembros. Este tipo de antibióticos actualmente se pueden clasificar en al menos siete grupos, entre los que se incluyen las

aminopenicilinas, las clavamas y las cefalosporinas. Los betalactámicos actúan inhibiendo las últimas fases de la formación de la pared bacteriana. Son bactericidas sobre bacterias que se encuentran en crecimiento activo pero no tienen efecto sobre células que no están en desarrollo.

La pared bacteriana mantiene la forma celular y protege a la bacteria de la rotura osmótica gracias a la estructura rígida que posee. Esta rigidez se la va a proporcionar un elemento constitutivo de dicha pared que es el peptidoglicano. Este elemento es común tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas y esta formando una larga cadena polisacárida constituida por repetición de moléculas de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico al que se unen pequeñas cadenas de péptidos, estas cadenas peptídicas se unen entre si por medio de enlaces entre sus aminoácidos.

La síntesis del peptidoglicano se puede dividir en tres fases, la primera constituye la síntesis de los precursores polisacáridicos, la siguiente etapa supone la traslocación de estos compuestos a través de la membrana citoplasmática y su transglicosidación al polímero de peptidoglicano, finalmente se establece la unión entre el peptidoglicano recién formado y el que ya existía, mediante una reacción de transpeptidación.

Los antibióticos betalactámicos actúan inhibiendo esta transpeptidación debido a que se unen e inactivan las enzimas que llevan a cabo esta reacción, a las transpeptidasas por ello también se las denomina proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs). Existen varias transpeptidasas y cada antibiótico tiene diferente afinidad para cada una de estas enzimas. Dependiendo de su unión a unas PBPs u otras los efectos que se producen sobre la bacteria son distintos: la unión a la PBP 1a, 1b, 2 y 3 provoca la lisis celular en E. coli, las PBPs 4, 5 y 6 no parecen ser esenciales para la viabilidad celular y no condicionan la acción de los betalactámicos (50). En general bastaría la unión a la PBP 1 para conducir a la lisis y muerte de la bacteria (20). Esta lisis se consigue con concentraciones mayores a la CMI, esto es, el antibiótico tiene

que superar un punto crítico de afinidad por las PBP letales. Si la CMI es baja el antibiótico en cuestión tiene mucha afinidad por la PBP 1 u otras PBP letales. Si por el contrario, la afinidad es baja, el fármaco se unirá primero a otras PBP y necesitaremos más concentración de antibiótico para eliminar la bacteria y la CMI será mayor.

Además de inhibir la transpeptidación, los β -lactámicos estimulan los sistemas autofágicos de las bacterias (51, 52).

3.2 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos más frecuentes por los que un microorganismo puede ser resistente a estos antibióticos son por la producción de betalactamasas que destruyen el antibiótico por hidrólisis del anillo betalactámico, reducción en la afinidad de las PBP por los antibióticos (53 - 56) y reducción en la permeabilidad celular de las bacterias al β -lactámico, impidiéndole alcanzar su lugar de acción. Este último mecanismo de resistencia sólo se produce en las bacterias gram-negativas (57).

3.3 Amoxicilina

3.3.1. Estructura química

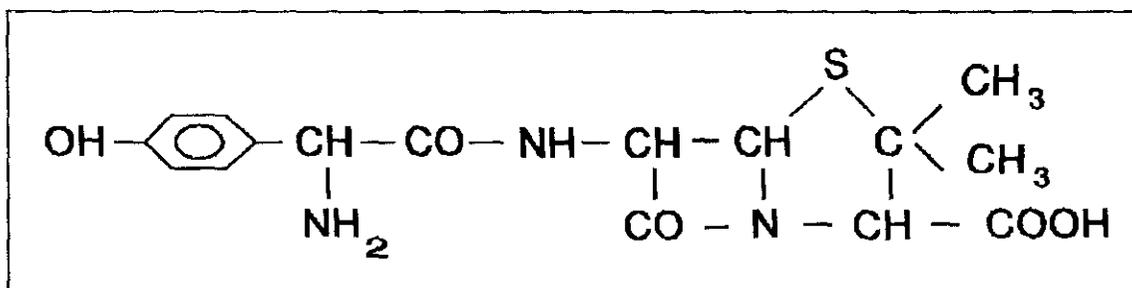


Figura 4. Estructura química de la amoxicilina.

3.3.2. Características generales

La amoxicilina es una penicilina semisintética del grupo de las aminopenicilinas, es uno de los antibióticos más ampliamente utilizado en clínica debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro antibacteriano, tanto frente a microorganismos grampositivos (cepas de Staphylococcus aureus no productores de penicilinas, Streptococcus haemoliticus, S. viridans, S. pneumoniae, Enterococcus faecalis, Clostridium tetani) como gramnegativos (Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis, E. coli, Salmonella typhi, Proteus mirabilis, Helicobacter pylori). Ciertas cepas de patógenos producen β -lactamasas y son resistentes, por lo que a veces se administra conjuntamente con ácido clavulánico. La amoxicilina tiene una elevada afinidad por la PBP 1a, 1b, 2 y algo menor por la 3 (58).

3.3.3. Farmacocinética

La unión de amoxicilina a las proteínas plasmáticas es muy baja, oscilando entre el 18% y el 20%. Es una molécula que se absorbe muy bien por vía oral. Los niveles máximos en suero que se obtienen tras la administración intravenosa de 1g de amoxicilina, son de aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$ (59). Si la administración es intramuscular, al cabo de una hora la concentración máxima en suero será de 22 $\mu\text{g/ml}$ y si es por vía oral obtendremos 12-13 $\mu\text{g/ml}$ por cada 500 mg. Las penicilinas, en términos generales, son poco metabolizadas en el organismo. La eliminación se produce principalmente por vía renal, alcanzando concentraciones elevadas en orina. La bilis también puede constituir una vía alternativa de eliminación.

3.4 Cefotaxima

Las cefalosporinas en general son antibióticos betalactámicos, bactericidas, y al igual que la amoxicilina muestran un amplio espectro bacteriano y escasa toxicidad por lo que también son muy utilizadas en la

práctica médica. Están formadas por un anillo betalactámico unido a otro de dihidrotiazina. En contraste con las penicilinas la molécula de cefalosporina tiene más lugares para su potencial manipulación, además, el núcleo de las cefalosporinas es inherentemente más resistente a las betalactamasas que el de las penicilinas (60). De cualquier forma, al igual que ocurre con estas, el mecanismo responsable de la inactivación de cefalosporinas más frecuente es la producción de betalactamasas.

3.4.1. Estructura química

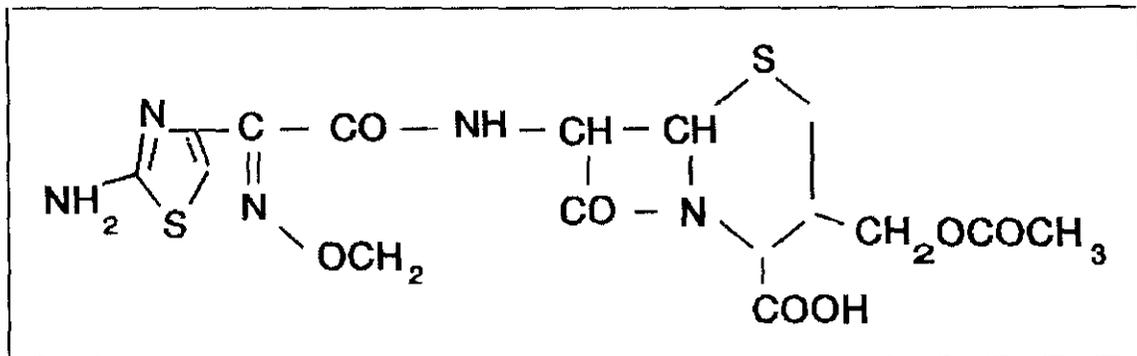


Figura 5. Estructura química de la cefotaxima.

3.4.2. Características generales

La cefotaxima es una cefalosporina de tercera generación que se administra por vía parenteral. Las células renales y los hepatocitos van a transformar la molécula en unos subproductos metabólicos con actividad antimicrobiana, el más importante es la desacetilcefotaxima (61). La desacetilcefotaxima tiene una alta afinidad por las PBP 1a, b y 3 de E. coli. La afinidad de cefotaxima por estas mismas moléculas es mayor (62).

La cefotaxima muestra una buena actividad frente a Streptococcus (S. pneumoniae, S. pyogenes) Staphylococcus aureus excepto las cepas resistentes a la meticilina y las coagulasa negativas, es muy activa frente a

muchas cepas de E. coli, Haemophilus influenzae y frente a muchas especies de Klebsiella, Proteus, Serratia y Neisseria.

3.4.3. Farmacocinética

La cefotaxima alcanza una unión a las proteínas del suero del 38%. Tras suministrar por vía intramuscular una dosis de 1 gramo del antibiótico se consigue, a la 1/2 hora, una concentración sérica máxima de 20,5 µg/ml. La eliminación se produce por el riñón y en un pequeño porcentaje también por vía biliar.

3.5 Acido clavulánico

3.5.1 Estructura química

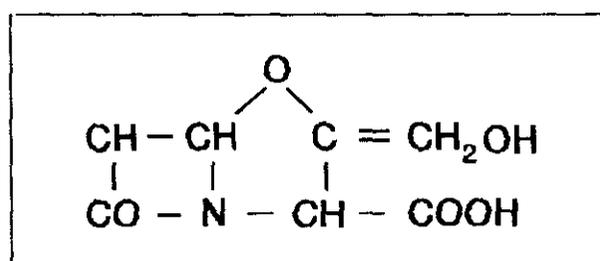


Figura 6. Estructura química del ácido clavulánico.

3.5.2 Características generales

El ácido clavulánico es un antibiótico β-lactámico que pertenece al grupo de las clavamas. Tiene una escasa actividad antimicrobiana, pero es capaz de inhibir una gran variedad de β-lactamasas, por lo que se administra en combinación con otras moléculas que no tienen esta capacidad pero que tienen una mayor actividad bactericida intrínseca, de esta forma se establece una actuación sinérgica entre ambos antimicrobianos frente a los microorganismos que son resistentes a penicilinas por producción de β-lactamasas. Generalmente se utiliza en combinación con amoxicilina.

El clavulánico presenta mayor afinidad por la PBP 2, la inhibición de esta proteína provoca en algunas especies bacterianas la formación de células esféricas y no interfiere con el proceso de división (63, 64).

3.5.3. Farmacocinética

La unión del ácido clavulánico a las proteínas plasmáticas es aproximadamente del 25 %. La vida media en suero es de 0.96 horas. La concentración máxima que se obtiene en el suero tras la administración vía oral de una dosis de 125 mg de clavulánico es de 4,75 µg/ml. Su excreción se realiza principalmente a través del riñón y alcanza el 42 % de la dosis administrada (65).

4 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Streptococcus pneumoniae es un importante patógeno que provoca meningitis, otitis media (66, 67), bacteriemias y es además la causa más común de neumonías bacterianas (68, 69). El neumococo, nombre más comúnmente utilizado para denominar a esta bacteria, está presente en la zona superior del tracto respiratorio de la mayor parte de los individuos sanos formando parte de la flora habitual.

Es un coco grampositivo que crece en caldo formando largas cadenas y parejas por lo que en principio también se le denominó diplococo. Cuando crece en placas de agar sangre, las colonias aparecen rodeadas de un halo típico de color verdoso, debido a que producen una hidrólisis parcial de los eritrocitos adyacentes, denominada alfa-hemólisis.

Algunas cepas de Streptococcus pneumoniae tienen una cápsula mucosa polisacáridica que rodea a su pared celular y que hace variar la sensibilidad de esta bacteria a la fagocitosis por parte de las células fagocitarias del sistema inmune. Las cepas virulentas tienen una cápsula

mayor que las cepas no virulentas lo que las hace más resistentes a la fagocitosis por parte de los leucocitos. La inmunidad depende de un anticuerpo que se une específicamente al polisacárido de la cápsula de la bacteria, es decir, esta cápsula es antigénica, pero hay más de 85 tipos antigénicos diferentes de pneumococos (70), y la inmunidad frente a uno, no protege al huésped frente al otro.

Los neumococos producen una hemolisina, también denominada neumolisina, que tiene un importante papel en la morbilidad y mortalidad asociada con la neumonía causada por esta bacteria. Además producen una autolisina implicada, en la separación de las células hijas al final de la división bacteriana, en la transformación genética, y en la lisis que se produce en estas bacterias provocada por los antibióticos β -lactámicos (71).

Los mecanismos por los que se producen resistencias a los antibióticos β -lactámicos en *S. pneumoniae* se deben a la alteración en las dianas del antimicrobiano, en este caso las PBPs, algunas de estas proteínas pierden eficacia en la unión a estos antibióticos con la consiguiente disminución en la efectividad del fármaco. En esta bacteria no se han descrito cepas productoras de β -lactamasas.

Los neumococos pueden clasificarse dependiendo de su sensibilidad frente a la penicilina, considerándose sensibles las cepas con una CMI igual o inferior a 0,06 $\mu\text{g/ml}$, con una resistencia intermedia las cepas que se encuentran en un intervalo entre 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, y resistentes o altamente resistentes las que tengan CMI superiores a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Nosotros trabajamos con tres cepas de diferente serotipo (3, 6, 9) y con diferente sensibilidad a la penicilina.

Las concentraciones de antibiótico utilizadas para llevar a cabo este trabajo fueron las concentraciones que se obtienen en diferentes intervalos de tiempo en el suero de un individuo que sigue una pauta de administración normal. De esta forma el ensayo fue lo más aproximado, en la medida de lo

posible, a la situación real que se produce en el organismo.

5 OBJETIVOS

Los objetivos planteados al realizar este trabajo fueron los siguientes:

1. Determinar comparativamente la eficacia de diferentes concentraciones de los antimicrobianos estudiados en la eliminación de *S. pneumoniae*, observando la variación en sus cinéticas de crecimiento.

2. Comparar las diferencias que se establecen entre el estudio de los resultados obtenidos con las CMI y los obtenidos con las cinéticas de letalidad bacteriana.

3. Estudiar la variación del efecto fagocítico producido por los PMN sobre *S. pneumoniae* cuando se administra amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, y cefotaxima. Establecer si existe sinergismo entre los antibióticos y los PMN en la eliminación de las bacterias.

4. Observar si la variación en la sensibilidad del microorganismo a la fagocitosis y/o muerte intracelular producida por los PMN depende del tipo de antibiótico y del microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODO

1 MATERIALES

1.1 Microorganismos

Los experimentos se realizaron utilizando tres aislados clínicos de Streptococcus pneumoniae, FJD (61), FJD (86), y FJD (75) de diferente serotipo (3, 6, 9 respectivamente) y sensibilidad a penicilina. Todas las cepas se conservaron en agar sangre (Bio-Merriex) a 4°C. Cada dos días se hicieron subcultivos en medio fresco.

El día anterior a cada ensayo se preparó un cultivo de la bacteria en caldo Todd-Hewitt (Difco) y se incubó a 37°C en una estufa de CO₂ hasta la mañana siguiente, esto es, de 16 a 18 horas. A partir de este cultivo se obtuvieron las bacterias en fase exponencial de crecimiento. Para ello un mililitro de este medio se diluyó en matraces con 25 ml de caldo fresco, y se incubó de 2 a 4 horas a 37°C en un agitador orbital (Lab-line Orbit Environ-Shaker) a 150 r.p.m. hasta alcanzar una absorbancia, medida con un espectrofotómetro (Hitachi mod. U-1100) a 580 nm, de entre 0,12 y 0,20 dependiendo de la cepa con la que se ensayó, lo que se correspondía con aproximadamente 10⁸ UFC/ml.

El tipo de medio recomendado por la NCCLS para estandarizar los resultados de las CMI de Streptococcus pneumoniae contiene un 5% de sangre, pero la gran turbidez que producía ésta, impedía obtener una medida del número de bacterias mediante el espectrofotómetro. El crecimiento de la bacteria en un medio de cultivo más general, como es el caldo Mueller-Hinton, produjo el aclaramiento de éste, por lo que tampoco se obtuvo una buena medida. Finalmente, por estas razones, se optó por el caldo Todd-Hewitt para llevar a cabo el estudio.

1.2 Antimicrobianos

Se utilizaron los siguientes antibióticos:

AMOXICILINA suministrada por los laboratorios Smithkline & Beecham, con una potencia de 845 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

CEFOTAXIMA de laboratorios Roussel Uclaf, con una potencia de 942 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

ACIDO CLAVULANICO suministrado por Smithkline & Beecham, con una potencia de 953 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Las soluciones de antibióticos se prepararon a partir de antibiótico en polvo valorado, que se disolvió en agua destilada a una concentración de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, almacenándose en viales a una temperatura de -70°C para su conservación hasta su uso.

Para obtener las concentraciones de antimicrobiano requeridas en cada caso se diluyó el contenido de los viales, previamente descongelados, en tampón fosfato 0,1 M a $\text{pH} = 6$, hasta alcanzar la concentración necesaria. El sobrante de la solución de antibiótico descongelado se deshechó.

1.3 Azul tripán al 4%

El colorante azul tripán (R.A.L. Ugine-Kuhlmann) se diluyó en agua destilada estéril (4 gramos en 100 ml de agua) y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

1.4 Gelatina al 1%

En 100 ml de agua destilada estéril se disolvió 1 g de gelatina en polvo (Sigma, Chemical Company) y se calentó al baño María. Una vez que la gelatina se había enfriado y solidificado se conservó en la nevera.

1.5 Solución salina equilibrada de Hank (Por litro de agua destilada estéril).

Sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} :

CINa	8,000	gramos
KCl	0,400	gramos
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,048	gramos
KH_2PO_4	0,060	gramos
Glucosa	1,000	gramos

Elementos adicionales para HBSS completo:

CaCl_2	0,140	gramos
NaHCO_3	0,350	gramos
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,160	gramos
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,100	gramos
Gelatina al 0,1%		

1.6 Solución isotónica de cloruro amónico (Por 1/2 litro de agua destilada estéril)

CINH_4	4,160	gramos
NaHCO_3	0,420	gramos

1.7 Tampón fosfato, 0,1 M

Monofosfato de sodio 0,1 M. 15,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se diluyeron en 1 litro de agua destilada.

Difosfato de sodio 0,1 M. 14,2 g de Na_2HPO_4 se diluían en 1 litro de agua.

Para obtener un pH de 6 se mezclaron 87,7 ml de tampón fosfato monobásico y 12,3 ml de tampón fosfato dibásico.

1.8 Obtención, recuento y viabilidad de los leucocitos PMN

1.8.1 Obtención

Los leucocitos PMN se extrajeron empleando una variación del método descrito por Paul Eggleton y cols. (72), que modificaron el original de Dioguardi (73) basado, fundamentalmente, en la utilización de cloruro amónico frío para lisar las células rojas.

La sangre venosa (4 ml) se extrajo de voluntarios sanos en tubos con EDTA potásico (1,5 mg/ml) para evitar su coagulación. Posteriormente se añadió a tubos cónicos estériles de poliestireno (25mm x 90mm, Soria Greiner S.A.) que contenían 16 ml de cloruro amónico frío (4°C) a pH 7,2. Después de mezclar bien, se mantuvo a 4°C durante 15 minutos con objeto de lisar los eritrocitos. A continuación, se centrifugó a 160g (centrífuga Selecta, mod. Meditronic) durante 10 minutos. Una vez extraído y desechado el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 16 ml de cloruro amónico frío para volver a repetir el proceso anterior, 15 minutos a 4°C y centrifugación durante 10 minutos, esta vez a una velocidad de 55g. Tras la segunda centrifugación al sedimento se le añadieron 5 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin calcio ni magnesio, manteniéndolo en frío hasta tener preparado el inóculo bacteriano.

Cuando se obtuvo el inóculo, se hizo una última centrifugación de los leucocitos en idénticas condiciones que las realizadas en la segunda centrifugación, resuspendiendo el sedimento en 2 ml de HBSS con gelatina al 0,1 %.

1.8.2 Recuento de los leucocitos

El recuento se realizó con un microscopio óptico (Nikon, mod S.E.) y

una cámara Neubauer.

La cámara consta de cuatro cuadrantes en la parte superior y cuatro en la inferior que tienen unas dimensiones conocidas (1,0 mm x 1,0 mm) y una altura hasta el cubreobjetos de 0,1 mm, es decir, un volumen de 0,1 mm³.

Contando el número de leucocitos que hay en todos los cuadrantes y haciendo la media para cada uno, se obtendrá un número determinado de leucocitos por cada 0,1 mm³. En cada mm³ habrá 10 veces más. Por tanto se multiplica este número de leucocitos por 10, para obtener así los leucocitos por mm³.

Se consideró un factor de corrección de dilución, ya que la solución de células se diluyó al 1:10 para hacer el recuento.

De esta forma el número de leucocitos/ml, que es al que siempre nos vamos a referir, será igual al número de leucocitos en cada mm³ por 1000:

$$\text{Leucocitos/ml} = \text{Leucocitos/mm}^3 \times 10 \times 1000$$

1.8.3 Viabilidad

La viabilidad de los leucocitos se estudió por diferenciación de las células teñidas y no teñidas con el colorante azul tripán (Merck).

Para ello añadimos a un volumen de 0,5 ml de suspensión de leucocitos otros 0,5 ml del colorante al 0,4%. Al cabo de tres minutos se añadió formaldehído al 10% y contamos en una cámara Neubauer.

La viabilidad se expresó como tanto por ciento de leucocitos viables, que presentaban el núcleo no teñido de azul, respecto del total:

$$\text{Porcentaje de células viables} = \frac{\text{PMNs viables}}{\text{PMNs viables} + \text{PMNs inviables}} \times 100$$

El resultado de la viabilidad medida al principio y al final del experimento fue del 98 y 95% respectivamente.

1.9 Obtención del suero

El suero se obtuvo dejando coagular sangre venosa de individuos sanos a temperatura ambiente. Después se retiró el coágulo y se centrifugó a 1.100g durante 20 minutos.

Tras la centrifugación se almacenó el suero en cantidades de 0,5 ml a -70°C para su conservación.

2. METODO

2.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se define CMI de un antibiótico frente a una bacteria como la cantidad menor de antibiótico, expresada en microgramos o unidades internacionales por mililitro de medio de cultivo, capaz de impedir el crecimiento visible de dicho microorganismo después de 18 - 24 horas de incubación.

2.2 Determinación de la CMI

Se realizó mediante el método de macrodilución en caldo (74).

A partir de los viales almacenados preparamos una solución de antibiótico a una concentración determinada, en caldo Todd-Hewitt. Esa concentración de partida era la más elevada de la serie y habría que tener en cuenta, que dicha concentración quedaría diluida a la mitad después de añadir 1 ml de inóculo bacteriano.

Con una micropipeta añadimos a un primer tubo de ensayo de una serie de ellos, 2 ml de la solución de antibiótico. Todos los demás tubos de la serie contaban con 1 ml de caldo.

A continuación se cogió 1 ml del primer tubo y lo añadimos al segundo que contaría entonces con un volumen de 2 ml, se agitó con un vortex (Heidolph Reux 2000). Se hizo lo mismo del segundo al tercer tubo repitiendo este proceso, y así sucesivamente hasta llegar al penúltimo tubo, después de agitar éste cogimos 1 ml y lo desechamos con el fin de que todos tuvieran el mismo volumen. En el último tubo de ensayo sólo quedó 1 ml de caldo sin antibiótico que serviría como control del proceso.

Ya teníamos una serie de tubos en los que el anterior de la serie contaba con el doble de concentración de la dilución de antibiótico que el siguiente, excepto el último o control.

Cuando los cultivos bacterianos en fase exponencial alcanzaron un número de 10^8 UFC/ml (por medida de la absorbancia a 580 nm, como ya se citó anteriormente), se hizo una dilución 1:100 en caldo de una alícuota del cultivo, para así obtener 10^6 UFC/ml. Se agregó posteriormente 1 ml del caldo bacteriano de esta concentración a cada tubo de ensayo. La concentración de antibiótico en cada tubo, era la mitad de la que era en principio y la concentración de las bacterias añadidas pasaría a 5×10^5 UFC/ml que era el inóculo estandar establecido por la NCCLS

Los tubos se incubaron en estufa de CO_2 (Haereus) de 16 a 20 horas a 37°C .

El mismo proceso se realizó dos veces para cada antibiotico con cada microorganismo.

2.3 Tratamiento de las bacterias

Cuando las bacterias en crecimiento exponencial alcanzaban una concentración en el caldo de 10^8 UFC/ml se toman 0.2 ml de esa suspensión y se añaden a un tubo de poliestireno estéril. El volumen final en el tubo era de 2 ml y se completo con caldo HBSS con gelatina más un 20 % de suero

humano normal (0.4 ml). Estas curvas nos sirvieron como control del proceso. En otros tubos se añadió 0.4 ml de la solución de PMN para determinar el efecto fagocítico y bactericida de estas células. La misma cantidad de caldo sería restada en dichos tubos. La relación final de bacterias frente a PMN fue de 1 a 1.

A las bacterias se les añadió una concentración de antibiótico de 0.5, 2, 4, 8 y 12 $\mu\text{g/ml}$, estas concentraciones eran las que obtenían en diferentes períodos de tiempo en el suero de un individuo tras un régimen de dosificación normal con los antibióticos ensayados.

Para conseguir la concentración de antibiótico con la que se trabajó en cada ensayo, diluimos la cantidad de antibiótico necesaria en un volumen final total de 2 ml de HBSS con gelatina, en los que estaba incluido el suero y en algunos casos PMN para determinar el efecto conjunto del fármaco y los neutrófilos.

En todos los casos los tubos se incubaban en agitación durante un periodo de tiempo de cuatro horas a una temperatura de 37 °C. En principio también se incluyó la toma de una muestra a las 24 horas de empezar el ensayo pero esta no se ha tenido en cuenta, debido a que en este tiempo se ve influida por la propia lisis de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* como así se observaba en los ensayos control y en otros estudios (75, 76).

De cada tubo de poliestireno se tomaron alícuotas a tiempo 0 y posteriormente cada hora hasta el total de las cuatro horas. Las alícuotas se añadieron a tubos de ensayo con agua destilada estéril para así lisar los PMN en los casos en que hubiera. A partir del tubo de ensayo se hicieron diluciones decimales y un volumen de 20 μl se sembró por triplicado en placas de agar sangre. Las placas se incubaron a 37 °C durante 20 a 24 horas en una estufa de CO₂. Pasado este tiempo se contó el número de colonias y se anotaron los resultados.

Para obtener el número de bacterias/ml, las UFC contadas se

multiplicaban por el factor corrector de la dilución correspondiente en cada caso.

Todos estos ensayos se realizaron frente a cada una de las cepas de Streptococcus pneumoniae dos veces para cada concentración antimicrobiana, obteniendo datos por triplicado de cada muestra.

2.8 Cálculo estadístico

Los resultados de este estudio se expresaron como media \pm el error estandar de la media. Las comparaciones estadísticas entre los distintos grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza seguido de un test Newman-Keuls. Se consideró como diferencias significativas cuando la probabilidad de que las diferencias de los resultados se deban al azar fuera menor de 0,05 (77).

RESULTADOS

1 RESULTADOS

En las tablas de resultados aparecen comparadas las cinéticas de crecimiento de una cepa de Streptococcus pneumoniae control, frente a 5 concentraciones diferentes de cada uno de los antibióticos estudiados. Los datos que se muestran son relativos al crecimiento de las bacterias en presencia y ausencia de PMN. Cada resultado que se expone es la media del incremento (\pm la desviación estandar) que se produce cada hora en la cinética de crecimiento de la bacteria con respecto al tiempo 0. Esto es, la diferencia entre el número de bacterias existentes en la hora cuarta, tercera, etc, frente al número de bacterias iniciales. Los datos figuran como logaritmos en base 10 del número de bacterias por cada ml, puesto que en el tratamiento de los resultados, para no obtener cantidades muy elevadas, se transformaron en unidades logarítmicas. Si los datos en cuestión son positivos significa que la cinética de crecimiento de la bacteria es ascendente (característica de controles y bacterias tratadas con poca concentración de antimicrobiano). Si por el contrario son negativos el número de bacterias esta decayendo, habrá mayor número de bacterias en el tiempo 0 que en los siguientes, en este caso la cinética bacteriana es de letalidad.

Esta forma de exponer los resultados es utilizada por la mayoría de los autores (10, 76, 78). De esta forma sólo nos fijamos en el incremento del crecimiento, o de la muerte, que se produce en las curvas estudiadas y obviamos el inconveniente de tener que examinar el número inicial de bacterias ya que las curvas pueden tener desplazados estos puntos iniciales.

En cada tabla aparecen las 5 concentraciones diferentes de antimicrobiano con las que se trabajó, por lo que se puede comparar fácilmente cuando se producen mayores descensos en la muerte bacteriana, y a que concentración de antimicrobiano, o en que tiempo es mayor la

fagocitosis.

En todos los casos se determinó si existía o no diferencia entre la cinética de crecimiento de las bacterias que crecían en un medio con PMN y las que lo hacían en ausencia de ellos, y si esta diferencia era significativa ($p < 0,05$).

En las tablas también se señala el porcentaje de fagocitosis alcanzado en cada hora del ensayo. Los porcentajes de fagocitosis que se muestran se refieren al porcentaje de reducción del número de colonias bacterianas que se desarrollaron en un medio con PMN frente a las que lo hacían en el mismo medio sin PMN, ya fueran ambas con o sin antibiótico. Estos porcentajes de fagocitosis son acumulativos, esto es, que en las horas posteriores se tiene en cuenta la fagocitosis que se ha producido en el tiempo anterior.

En la evaluación de los resultados se estudió el posible efecto sinérgico del antibiótico junto con los PMN en la eliminación de bacterias. Se consideró que presentaban efecto sinérgico, si la suma del efecto provocado por el antimicrobiano más el causado por los PMN cuando intervenían por separado era menor que el efecto causado por ambos cuando actuaban de forma conjunta.

También se exponen gráficas con las cinéticas de crecimiento de los neumococos. Los puntos de estas gráficas también se expresan como logaritmos en base 10 del número de bacterias por ml y permiten observar de una forma más visual que las tablas el crecimiento o muerte de las bacterias.

En ocasiones se ha señalado otro modo de exponer los resultados examinando las áreas que quedan bajo la curva de crecimiento o letalidad que describe la cinética bacteriana, a partir de la integración de dicha curva. Aunque este método de analizar los resultados es una posible alternativa, hay que tener en cuenta, como ya hemos mencionado anteriormente, que estos datos son dependientes del punto de inicio de las curvas y si tenemos gráficas con diferentes puntos iniciales, estos quedarían recogidos en las áreas bajo

la curva como diferencias entre estas gráficas, cuando en realidad tan sólo son diferencias en su punto inicial.

2. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS

En la tabla 1 se recogen las CMI's obtenidas para las 3 cepas de S. pneumoniae frente a cada uno de los antibióticos con los que se realizó el ensayo.

3 EFECTO DE LOS PMN, LOS ANTIBIÓTICOS Y EFECTO CONJUNTO SOBRE S. PNEUMONIAE.

3.1 Estudio del serotipo 3 de S. pneumoniae.

3.1.1 Efecto de los PMN

En la tabla 2 se observa la evolución de las cinéticas de crecimiento de una cepa sensible a penicilina de Streptococcus pneumoniae tratada con concentraciones crecientes de amoxicilina y los respectivos controles sin antibiótico. No se hallaron diferencias significativas entre las bacterias que crecían junto con PMN y las que no lo hacían ($p < 0.05$). En este último caso los PMN no se mostraron eficaces, por si mismos, en la eliminación de este serotipo 3 de S. pneumoniae.

3.1.2 Efecto de amoxicilina

El crecimiento bacteriano fue negativo con concentraciones de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina (tabla 2). Aunque la concentración de antibiótico era escasa, esto ya suponía un incremento de aproximadamente unas 16 veces la CMI para esta cepa sensible a penicilinas, de forma que las bacterias comenzaban a morir desde el mismo momento en que eran incluidas en el medio con el antibiótico.

La disminución del número de bacterias iba siendo progresiva según aumentábamos la concentración de antimicrobiano, alcanzándose la menor cifra de UFC/ml a 8 y 12 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 1). Parecía existir una concentración-dependencia en la eliminación de las bacterias por parte del antibiótico, hasta llegar a 8 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.3 Efecto conjunto de amoxicilina y PMNs

Observando las tablas y curvas en las que se incluían PMN en el medio (tabla 2, fig. 2), se comprobó que también disminuía el número de bacterias según aumentaba la concentración de antibiótico. Pero el mayor porcentaje de fagocitosis se consiguió, sin embargo, con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina. No advirtió, por tanto, una relación entre la concentración antibiótica y la fagocitosis

En todas las concentraciones se producía un efecto sinérgico entre antibiótico y PMN que como acabamos de ver, era mayor a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, representado por esta mayor tasa de fagocitosis. En este caso, los efectos bactericidas de PMN y antimicrobiano por separado eran menores que su efecto conjunto.

La fagocitosis se consiguió, sobre todo, durante la primera y la segunda horas del ensayo. Luego ya existía poca fagocitosis y en algunos casos no la había.

3.1.4 Efecto de amoxicilina/ácido clavulánico

En la tabla 3 y fig. 3 se observa la evolución de la letalidad de *S. pneumoniae* tratado con amoxicilina-ácido clavulánico. Según se aumentó la dosis de la combinación antibiótica la letalidad de la bacteria aumentaba. Con concentraciones de 0.5-0.1 $\mu\text{g/ml}$ la curva marcó un inclinado descenso, al igual que ocurría con el tratamiento a la concentración más baja de amoxicilina.

Según se añadía antibiótico al medio el número de bacterias disminuía aunque no en relación directa con la concentración antimicrobiana y se detuvo al final del ensayo al igual que ocurría en el caso de amoxicilina.

3.1.5 Efecto conjunto de amoxicilina/ácido clavulánico y PMNs

El efecto conjunto de los PMN y el antibiótico hizo disminuir progresivamente el número de microorganismos y al igual que en el caso anterior existió sinergismo en todas las concentraciones ensayadas (tabla 3, fig. 4). En este caso los mayores porcentajes de fagocitosis y muerte bacteriana se presentaban con una dosis de 8 $\mu\text{g/ml}$, aunque ya a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ se observaban unos porcentajes similares y a partir de ese punto la fagocitosis no se incrementó mucho. Tanto en un medio con PMN como cuando no existían estos, el número de bacterias se seguía reduciendo según se aumentaba la concentración antimicrobiana hasta que alcanzamos 8 $\mu\text{g/ml}$.

La fagocitosis no tuvo transcendencia después de la segunda hora del tratamiento puesto que los porcentajes de fagocitosis no continuaban elevándose después de esta hora.

Para comparar este resultado con el efecto producido por amoxicilina, se puede decir que, en general, los porcentajes de fagocitosis eran más altos en el caso anterior, excepto en la hora primera del ensayo. De igual forma, las cinéticas de letalidad bacteriana en presencia de PMN eran algo más bajas con amoxicilina, donde al final del ensayo se conseguía, con casi todas las concentraciones de antibiótico utilizadas, unos niveles menores de bacterias. Aunque estas diferencias no eran muy importantes.

En este caso la combinación antimicrobiana sin PMN consiguió unos niveles de bacterias similares a la amoxicilina sola, aunque el sinergismo producido con el sistema inmune era mayor con amoxicilina.

3.1.6 Efecto de cefotaxima

La disminución del número de bacterias que se produjo con cefotaxima era elevada, se producía durante todo el ensayo y de forma progresiva al aumentar la concentración de antibiótico, aunque la reducción no fue tan grande como la que provocó amoxicilina ni la unión de amoxicilina-clavulánico (tabla 4, fig. 5).

3.1.7 Efecto de cefotaxima y PMNs

La cinética de letalidad bacteriana evolucionaba de forma más rápida en presencia de leucocitos PMNs, el número de bacterias se reducía significativamente ($p < 0,05$) respecto a cuando no se añadían al medio los PMN. Sin embargo los porcentajes de fagocitosis eran escasos y en la primera hora de ensayo, en general, no se observó sinergismo. En horas posteriores si apareció este fenómeno, aunque no tuvo la importancia que con el antibiótico anterior.

Al igual que ocurrió con amoxicilina, la mayor fagocitosis y muerte intracelular se consiguió con concentraciones bajas de antimicrobiano, en concreto, en este caso fue a la concentración de $2 \mu\text{g/ml}$ (tabla 4, fig 6).

3.2 Estudio del serotipo 6 de S. pneumoniae

3.2.1 Efecto de los PMNs

El serotipo 6 de pneumococco, a diferencia del serotipo anterior, era sensible al ataque por parte de los PMN y del suero humano. Hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre el crecimiento de las bacterias control y las que se expusieron al ataque de los PMN. Esta diferencia fue muy elevada, alcanzándose el máximo porcentaje de fagocitosis, un 60 %, en la cuarta hora de ensayo (tabla 5). El serotipo 6 de S. pneumoniae fue la cepa que más fácilmente era eliminada por los PMN.

3.2.2 Efecto de amoxicilina

El número de bacterias se redujo progresivamente hasta alcanzar la concentración de $8 \mu\text{g/ml}$ de amoxicilina. Con dosis superiores de antimicrobiano la reducción de microorganismos durante la segunda y tercera hora de ensayo era prácticamente similar a la que se había obtenido con la concentración de $8 \mu\text{g/ml}$, estabilizándose el número de bacterias (tabla 5, fig. 7).

3.2.3 Efecto de amoxicilina y PMNs

En la figura 8 observamos como el efecto de amoxicilina y los PMN hacían disminuir el número de bacterias de forma rápida y sin límite, en todas las concentraciones de antibiótico utilizadas. Aunque los porcentajes de fagocitosis también fueron muy elevados durante todo el ensayo (tabla 5), llegaron a estabilizarse, puesto que después de $4 \mu\text{g/ml}$ no se incrementaban dichos porcentajes.

A diferencia de lo que ocurría con la cepa sensible, en el caso del serotipo 6 la fagocitosis era más homogénea durante el tiempo que duró el ensayo y no sólo se producía en las dos primeras horas, aunque era realmente en la primera hora cuando tenía lugar la máxima fagocitosis. También se puede hablar de una homogeneidad de la fagocitosis en cuanto a la concentración de antimicrobiano.

Del sinergismo existente entre los PMN y amoxicilina, cabe decir, que en esta cepa era muy elevado, y se producía durante todo el tiempo que duraba el ensayo y para todas las concentraciones.

Un hecho importante que merece la pena resaltar es que a la menor concentración de antibiótico ensayada ($0.5 \mu\text{g/ml}$) se producía un crecimiento en la cinética bacteriana, pero si tenemos en cuenta la misma concentración en presencia de PMN la cinética bacteriana era de letalidad.

3.2.4 Efecto de amoxicilina/ácido clavulánico

La reducción del número de colonias comenzaba en 0.5 $\mu\text{g/ml}$, aunque no era una disminución demasiado grande (fig. 9), puesto que nos encontrábamos en valores cercanos a la CMI. Esta reducción continuó produciéndose con todas las concentraciones ensayadas, de tal forma que cuanto mayor era la dosis de antibiótico, menor era el número de bacterias (tabla 6).

La amoxicilina, en esta cepa de resistencia intermedia, consiguió disminuir más bacterias que la combinación amoxicilina-ácido clavulánico (ver las concentraciones 8 y 12 $\mu\text{g/ml}$ y a la tercera y cuarta hora de ensayo). Estos niveles parecen ser los máximos que pueden conseguirse, ya que con esas dosis la respuesta se estabilizaba. Por otra parte, fuera de estos puntos, la amoxicilina-clavulánico actuaba de forma más potente.

3.2.5 Efecto de amoxicilina/ácido clavulánico y PMNs

Para todas las dosis existió un aumento de la fagocitosis significativo respecto a las bacterias que crecieron sin PMN ($p < 0,05$).

Las cinéticas de crecimiento en presencia de PMN fueron inferiores con amoxicilina sola que en este caso, excepto a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 10). De igual forma, los porcentajes de fagocitosis y muerte intracelular aún siendo elevados, eran menores que los observados con amoxicilina (tabla 6).

Al igual que en casos anteriores también se observó sinergismo entre los PMN más amoxicilina y clavulánico, en la eliminación de esta cepa de *Streptococcus pneumoniae*.

3.2.6 Efecto de cefotaxima

En este experimento la reducción del número de bacterias se conseguía a partir de concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$ y superiores, aunque con PMN, ya

desde 0.5 $\mu\text{g/ml}$ las bacterias entraban en una fase de muerte, efecto similar al que se produjo con amoxicilina (tabla 7, fig. 11). Con concentraciones mayores de antimicrobiano encontrábamos una elevada y rápida disminución del número de microorganismos.

3.2.7 Efecto de cefotaxima y PMNs

Cuando existan PMN en el medio de cultivo se obtuvo una reducción del número de neumococos significativamente mayor ($p < 0,05$), que cuando no los añadimos.

Los porcentajes de fagocitosis aunque fueron ligeramente más bajos eran muy similares a los obtenidos para amoxicilina (tabla 7, fig. 12).

Con esta cepa de serotipo 6 se consiguió una gran fagocitosis durante todo el ensayo y con todos los antimicrobianos utilizados. El porcentaje mayor de fagocitosis para cefotaxima se obtuvo con la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$.

En todos los tiempos y concentraciones estudiados pudo observarse un efecto sinérgico entre antibiótico y PMN en la eliminación de las bacterias.

3.3 Estudio del serotipo 9 de S. pneumoniae

3.3.1 Efecto de los PMNs

La cepa de pneumococco de serotipo 9 era sensible al ataque por parte de los PMN (tabla 8). En el caso de las bacterias control la fagocitosis fue significativa ($p < 0.05$) a partir de la segunda hora de ensayo, aunque los porcentajes de fagocitosis que se obtuvieron fueron muy pequeños.

3.3.2 Efecto de amoxicilina

Con 2 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina la cinética de crecimiento de la bacteria era ascendente, por lo que esta concentración antibiótica no fue suficiente para eliminar las bacterias ni para detener su crecimiento. Sólo a partir de 4 $\mu\text{g/ml}$ comenzó a reducirse el número de bacterias, esta reducción era mayor cada

vez que aumentábamos la concentración de amoxicilina (tabla 8, fig. 13).

3.3.3 Efecto de amoxicilina y PMNs

Al igual que ocurría cuando no se añadieron neutrófilos en el caldo de cultivo, con PMN y a concentraciones bajas, la cinética no era de letalidad (fig. 14).

La fagocitosis y muerte intracelular a concentraciones de $0.5 \mu\text{g/ml}$ seguía siendo pequeña (sólo era significativa, $p < 0,05$, a partir de la segunda hora), y no era hasta la siguiente concentración ensayada, cuando se obtuvieron niveles más altos.

No se produjo sinergismo con esta concentración de $0.5 \mu\text{g/ml}$, aunque si apareció con concentraciones mayores.

Los porcentajes de fagocitosis se incrementaron con la concentración y también con el tiempo que duró el ensayo, esto es, en la mayoría de los casos aun se producía fagocitosis en la hora cuarta (tabla 8).

3.3.4 Efecto de amoxicilina/ácido clavulánico

En la figura 15 observamos las curvas de crecimiento de *S. pneumoniae* en presencia de la combinación antimicrobiana amoxicilina más ácido clavulánico. Igual que en el caso anterior las cinéticas bacterianas fueron ascendentes hasta llegar a $4 \mu\text{g/ml}$. Se produjo una disminución más rápida del número de bacterias que la que se producía con amoxicilina sola (o un crecimiento más lento en el caso de que las curvas fueran ascendentes). En este caso se consiguió un efecto sobre el crecimiento bacteriano más rápido con la combinación amoxicilina-ácido clavulánico que solamente con amoxicilina, aunque en ambos casos la CMI fuera igual (tabla 9).

3.3.5 Efecto de amoxicilina/ácido clavulánico y PMN

Cuando existían PMN en el caldo (tabla 9, fig. 16) y con

concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$ la cinética bacteriana disminuyó. Los PMN colaboran con el antibiótico en la eliminación de las bacterias logrando cambiar la marcha ascendente de la cinética de crecimiento bacteriana por una descendente o de letalidad. En todos los casos existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cinéticas de crecimiento de las bacterias que crecieron sin neutrófilos y las que lo hicieron en presencia de ellos.

También se observaron diferencias entre ambos antibióticos, favorables a la combinación antimicrobiana, cuando se añadían PMN al medio de cultivo.

Los porcentajes de fagocitosis eran menos homogéneos que los obtenidos con amoxicilina, y salvo en ocasiones puntuales donde había ligeras fluctuaciones como ocurría en la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$, estos porcentajes iban aumentando con la concentración.

En períodos de tiempo largos, como en el $t=4$, y con cantidades grandes de antimicrobiano apenas variaba la fagocitosis respecto a tiempos y dosis anteriores. Esta respuesta fagocítica era mayor para el caso de la amoxicilina. Salvo en estas situaciones la combinación antibiótica ofrecía una mejora en la eliminación de esta bacteria frente a amoxicilina en solitario.

El sinergismo era patente a lo largo de todo el ensayo.

3.3.6 Efecto de cefotaxima

En la tabla 10 se observa la evolución de la cinética de pneumococco tratado con cefotaxima. Hasta una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ la evolución fue positiva, a partir de 2 $\mu\text{g/ml}$ el número de bacterias descendió. Con dosis bajas de antibiótico (0.5 y 2 $\mu\text{g/ml}$), cefotaxima actuaba mejor que amoxicilina y que amoxicilina/clavulánico frente a esta cepa de *S. pneumoniae*. Posteriormente la eliminación bacteriana se equilibraba y con dosis elevadas cefotaxima perdía eficacia (fig. 17).

3.3.7 Efecto de cefotaxima y PMNs

El estudio de la evolución del número de bacterias en presencia de antibiótico y PMN confirmó que los neumococos disminuían su número a partir de 2 $\mu\text{g/ml}$, igual que en el caso anterior sin neutrófilos, pero ahora descendiendo de forma más rápida (tabla 10, fig. 18).

La fagocitosis era significativa ($p < 0,05$) en todos los tiempos y a todas las concentraciones ensayadas. Los porcentajes de fagocitosis no fueron tan altos como en el serotipo 6, aunque si eran elevados, y se situaron en torno al 90 % en las dos últimas horas de ensayo y a las concentraciones de 0.5, 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$.

En comparación con amoxicilina, habría que indicar que mientras esta actuaba mejor con dosis altas (a partir de 8 $\mu\text{g/ml}$), la cefotaxima presentaba mayores porcentajes de fagocitosis con concentraciones bajas.

En todas las dosis se observó un efecto sinérgico.

3.3.8 Efecto sinérgico

El efecto sinérgico establecido entre los PMN y los antibióticos, en la eliminación de las bacterias, que comentamos a lo largo de esta exposición se muestra en las tablas 11 - 13. Los resultados son los que obtuvimos en la hora cuarta de ensayo.

FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias de los antibioticos utilizados en este estudio frente a las tres cepas de Streptococcus pneumoniae.

	AMOXICILINA	AMX/CLV	CEFOTAXIMA
SEROTIPO 3	0.03	0.03	0.03
SEROTIPO 6	0.25	0.25	0.12
SEROTIPO 9	2	2	2

Tabla 2. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de *Streptococcus pneumoniae* (serotipo 3) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de amoxicilina expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.52 \pm 0.15	0.85 \pm 0.18	1.12 \pm 0.15	1.45 \pm 0.29
C P	0.45 \pm 0.11	0.78 \pm 0.18	1.11 \pm 0.07	1.38 \pm 0.16
% FAGOC.	14.89	14.89	2.28	14.89

0,5	-0.93 \pm 0.08	-1.20 \pm 0.04	-1.79 \pm 0.08	-2.15 \pm 0.05
0,5 P	-1.81 \pm 0.01	-2.44 \pm 0.04	-2.90 \pm 0.04	-3.32 \pm 0.04
% FAGOC.	86.82	94.25	92.24	93.24

2	-1.26 \pm 0.05	-1.72 \pm 0.05	-2.32 \pm 0.09	-2.65 \pm 0.12
2 P	-1.54 \pm 0.02	-2.93 \pm 0.06	-3.22 \pm 0.02	-3.49 \pm 0.04
% FAGOC.	47.52	93.84	87.41	85.55

4	-1.29 \pm 0.01	-1.76 \pm 0.10	-2.38 \pm 0.02	-2.78 \pm 0.12
4 P	-1.70 \pm 0.01	-2.95 \pm 0.04	-3.19 \pm 0.08	-3.50 \pm 0.01
% FAGOC.	61.10	93.54	84.51	80.95

8	-1.16 \pm 0.01	-1.73 \pm 0.01	-2.83 \pm 0.07	-3.21 \pm 0
8 P	-1.62 \pm 0.02	-2.52 \pm 0.11	-3.56 \pm 0.03	-4.15 \pm 0.01
% FAGOC.	65.33	83.78	81.38	88.52

12	-1.23 \pm 0.01	-2.05 \pm 0.01	-2.86 \pm 0.04	-3.20 \pm 0.05
12 P	-1.77 \pm 0.03	-2.88 \pm 0.03	-3.61 \pm 0	-4.19 \pm 0.01
% FAGOC.	71.16	85.21	82.22	89.77

Tabla 3. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 3) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de amoxicilina-ac. clavulánico expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.52 \pm 0.15	0.85 \pm 0.18	1.12 \pm 0.15	1.45 \pm 0.29
C P	0.45 \pm 0.11	0.78 \pm 0.18	1.11 \pm 0.07	1.38 \pm 0.16
% FAGOC.	14.89	14.89	2.28	14.89

0,5/0,1	-1.16 \pm 0.16	-1.57 \pm 0.04	-1.97 \pm 0	-2.31 \pm 0.03
0,5/0,1 P	-1.73 \pm 0.19	-2.06 \pm 0.08	-2.39 \pm 0.06	-2.82 \pm 0.04
% FAGOC.	73.09	69.10	61.98	69.10

2/0,5	-1.13 \pm 0.01	-1.64 \pm 0.06	-2.14 \pm 0.03	-2.50 \pm 0.04
2/0,5 P	-1.67 \pm 0.09	-2.27 \pm 0.11	-2.89 \pm 0.07	-3.20 \pm 0.19
% FAGOC.	71.16	76.56	82.22	81.80

4/1	-1.33 \pm 0.04	-1.73 \pm 0.06	-2.47 \pm 0.09	-2.90 \pm 0.13
4/1 P	-2.08 \pm 0.02	-2.63 \pm 0.03	-3.31 \pm 0.04	-3.56 \pm 0.10
% FAGOC.	82.22	87.41	85.55	78.12

8/1,5	-1.47 \pm 0.04	-2.09 \pm 0.09	-2.75 \pm 0.04	-3.19 \pm 0.08
8/1,5 P	-2.31 \pm 0.01	-3.05 \pm 0.03	-3.58 \pm 0.04	-3.90 \pm 0.10
% FAGOC.	85.55	89.04	85.21	80.50

12/2,5	-1.53 \pm 0.01	-2.23 \pm 0.03	-2.66 \pm 0.07	-3.25 \pm 0.05
12/2,5 P	-2.08 \pm 0.03	-2.99 \pm 0.03	-3.49 \pm 0.01	-4.06 \pm 0.06
% FAGOC.	71.82	82.62	85.21	84.21

Tabla 4. Diferencias entre el tiempo t y t=0 en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 3) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de cefotaxima expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.52 \pm 0.15	0.85 \pm 0.18	1.12 \pm 0.15	1.45 \pm 0.29
C P	0.45 \pm 0.11	0.78 \pm 0.18	1.11 \pm 0.07	1.38 \pm 0.16
% FAGOC.	14.89	14.89	2.28	14.89

0,5	-0.12 \pm 0.04	-0.60 \pm 0.06	-1.23 \pm 0.11	-1.79 \pm 0.02
0,5 P	-0.25 \pm 0.05	-0.91 \pm 0.09	-1.65 \pm 0.13	-2.10 \pm 0.09
% FAGOC.	25.87	51.02	61.98	51.02

2	-0.33 \pm 0.14	-0.79 \pm 0.04	-1.46 \pm 0.03	-1.96 \pm 0.02
2 P	-0.40 \pm 0.15	-1.18 \pm 0.29	-1.98 \pm 0.32	-2.62 \pm 0.29
% FAGOC.	14.89	59.26	69.80	78.12

4	-0.51 \pm 0.04	-0.97 \pm 0.06	-1.54 \pm 0	-2.13 \pm 0.04
4 P	-0.59 \pm 0.06	-1.19 \pm 0.13	-2.00 \pm 0.16	-2.64 \pm 0.16
% FAGOC.	16.82	39.74	65.33	69.10

8	-0.55 \pm 0.03	-1.05 \pm 0.04	-1.69 \pm 0.16	-2.24 \pm 0.17
8 P	-0.69 \pm 0.13	-1.23 \pm 0.13	-1.98 \pm 0.28	-2.63 \pm 0.26
% FAGOC.	27.56	33.93	48.71	59.26

12	-0.68 \pm 0.01	-1.16 \pm 0.02	-1.82 \pm 0.03	-2.48 \pm 0.06
12 P	-0.83 \pm 0.10	-1.44 \pm 0.10	-2.14 \pm 0.03	-2.82 \pm 0.04
% FAGOC.	29.21	47.52	52.14	54.29

Tabla 5. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 6) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de amoxicilina expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.59 \pm 0.36	1.24 \pm 0.26	1.91 \pm 0.19	2.19 \pm 0.07
C P	0.30 \pm 0.36	0.90 \pm 0.38	1.52 \pm 0.50	1.79 \pm 0.35
% FAGOC.	48.71	54.29	59.26	60.19

0,5	-0.02 \pm 0.02	0.28 \pm 0.03	0.49 \pm 0.11	0.63 \pm 0.03
0,5 P	-0.76 \pm 0.10	-1.16 \pm 0.15	-1.53 \pm 0.16	-1.86 \pm 0.19
% FAGOC.	81.80	96.29	99.02	99.67

2	-0.46 \pm 0.02	-1.03 \pm 0.04	-1.46 \pm 0.16	-1.81 \pm 0.14
2 P	-2.17 \pm 0.12	-3.36 \pm 0.19	-3.79 \pm 0.11	-4.22 \pm 0.10
% FAGOC.	98.05	99.53	99.53	99.61

4	-0.57 \pm 0.03	-1.15 \pm 0.03	-1.62 \pm 0.01	-2.00 \pm 0.04
4 P	-2.41 \pm 0.04	-3.61 \pm 0.08	-4.23 \pm 0.08	-4.73 \pm 0.23
% FAGOC.	98.56	99.65	99.76	99.81

8	-0.53 \pm 0.06	-1.53 \pm 0.03	-2.50 \pm 0.08	-3.44 \pm 0.15
8 P	-2.70 \pm 0.06	-3.78 \pm 0.09	-4.49 \pm 0.11	*
% FAGOC.	99.32	99.44	98.98	

12	-0.74 \pm 0.04	-1.60 \pm 0.08	-2.55 \pm 0.01	-3.48 \pm 0.04
12 P	-2.67 \pm 0.01	-4.38 \pm 0.17	-4.84 \pm 0.15	*
% FAGOC.	98.83	99.83	99.49	

* Datos fuera de escala.

Tabla 6. Diferencias entre el tiempo t y t=0 en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 6) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de amoxicilina-ác. clavulánico expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.59 \pm 0.36	1.24 \pm 0.26	1.91 \pm 0.19	2.19 \pm 0.07
C P	0.30 \pm 0.36	0.90 \pm 0.38	1.52 \pm 0.50	1.79 \pm 0.35
% FAGOC.	48.71	54.29	59.26	60.19

0,5/0,1	-0.37 \pm 0.06	-0.56 \pm 0.09	-0.73 \pm 0.07	-0.96 \pm 0.04
0,5/0,1 P	-1.02 \pm 0.06	-1.57 \pm 0.13	-2.20 \pm 0.11	-2.62 \pm 0.10
% FAGOC.	77.61	90.23	96.61	97.81

2/0,5	-0.73 \pm 0.03	-1.26 \pm 0.03	-1.75 \pm 0.04	-2.13 \pm 0.09
2/0,5 P	-1.35 \pm 0.06	-2.13 \pm 0.09	-2.89 \pm 0.12	-3.57 \pm 0.23
% FAGOC.	76.01	85.88	92.76	96.37

4/1	-0.95 \pm 0.04	-1.49 \pm 0.02	-1.93 \pm 0.06	-2.32 \pm 0.06
4/1 P	-1.74 \pm 0.08	-2.71 \pm 0.06	-3.60 \pm 0.01	-4.11 \pm 0.11
% FAGOC.	83.78	93.97	97.86	98.38

8/1,5	-1.11 \pm 0.02	-1.65 \pm 0.13	-2.25 \pm 0.14	-2.69 \pm 0.15
8/1,5 P	-2.00 \pm 0.09	-2.95 \pm 0.13	-3.85 \pm 0.13	-4.43 \pm 0.19
% FAGOC.	87.12	94.99	97.49	98.18

12/2,5	-1.11 \pm 0.04	-1.88 \pm 0.03	-2.45 \pm 0.06	-2.99 \pm 0.14
12/2,5 P	-2.04 \pm 0.01	-3.17 \pm 0.08	-4.08 \pm 0.10	-4.69 \pm 0.07
% FAGOC.	88.25	94.87	97.66	98.01

Tabla 7. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 6) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de cefotaxima expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.59 ± 0.36	1.24 ± 0.26	1.91 ± 0.19	2.19 ± 0.07
C P	0.30 ± 0.36	0.90 ± 0.38	1.52 ± 0.50	1.79 ± 0.35
% FAGOC.	48.71	54.29	59.26	60.19

0,5	0.30 ± 0.03	0.58 ± 0.05	0.81 ± 0.11	0.81 ± 0.09
0,5 P	-0.46 ± 0.09	-0.86 ± 0.14	-1.11 ± 0.02	-1.36 ± 0.04
% FAGOC.	82.62	96.37	98.80	99.32

2	-0.15 ± 0.09	-0.77 ± 0.06	-1.74 ± 0.01	-2.51 ± 0.12
2 P	-0.99 ± 0.04	-2.55 ± 0.03	-3.31 ± 0.09	-3.60 ± 0.16
% FAGOC.	85.55	98.34	97.31	91.87

4	-0.78 ± 0.05	-1.44 ± 0.13	-2.22 ± 0.01	-2.72 ± 0.11
4 P	-1.89 ± 0.11	-3.69 ± 0.15	-4.28 ± 0.09	-4.85 ± 0.04
% FAGOC.	92.24	99.44	99.13	99.26

8	-0.91 ± 0.04	-1.89 ± 0.06	-2.44 ± 0.04	-2.80 ± 0.19
8 P	-1.91 ± 0.02	-3.75 ± 0.11	-4.28 ± 0.04	-4.94 ± 0.01
% FAGOC.	90.00	98.62	98.56	96.69

12	-0.85 ± 0.01	-1.77 ± 0.03	-2.43 ± 0.04	-3.04 ± 0.09
12 P	-1.87 ± 0.02	-3.87 ± 0.06	-4.35 ± 0.11	-4.96 ± 0
% FAGOC.	90.45	99.21	98.80	98.80

Tabla 8. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 9) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de amoxicilina expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.80 \pm 0.08	1.50 \pm 0.15	2.02 \pm 0.16	2.34 \pm 0.07
C P	0.72 \pm 0.24	1.36 \pm 0.06	1.92 \pm 0.15	2.23 \pm 0.12
% FAGOC.	16.82	27.56	20.57	22.38

0,5	0.71 \pm 0.08	1.35 \pm 0.09	1.80 \pm 0.04	1.83 \pm 0.07
0,5 P	0.66 \pm 0.06	1.22 \pm 0.11	1.59 \pm 0.06	1.57 \pm 0.17
% FAGOC.	10.88	25.87	38.34	45.05

2	0.29 \pm 0.02	0.72 \pm 0.05	0.98 \pm 0.17	1.20 \pm 0.23
2 P	-0.05 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04	0.76 \pm 0.23
% FAGOC.	54.29	77.09	79.58	63.69

4	-0.10 \pm 0.04	-0.60 \pm 0.03	-1.08 \pm 0.02	-1.27 \pm 0.08
4 P	-0.33 \pm 0.03	-1.07 \pm 0.06	-1.74 \pm 0.01	-2.27 \pm 0.01
% FAGOC.	41.12	66.12	78.12	90.00

8	-0.40 \pm 0.04	-0.71 \pm 0.04	-1.20 \pm 0.05	-1.34 \pm 0.01
8 P	-0.79 \pm 0.05	-1.57 \pm 0.06	-2.45 \pm 0.06	-2.95 \pm 0.04
% FAGOC.	59.26	86.20	94.38	97.43

12	-0.46 \pm 0.04	-0.94 \pm 0.04	-1.37 \pm 0.04	-1.66 \pm 0.06
12 P	-0.97 \pm 0.02	-2.15 \pm 0.03	-2.98 \pm 0.05	-3.29 \pm 0.03
% FAGOC.	69.10	93.84	97.55	97.66

Tabla 9. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 9) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de amoxicilina-ác. clavulánico expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.80 \pm 0.08	1.50 \pm 0.15	2.02 \pm 0.16	2.34 \pm 0.06
C P	0.72 \pm 0.24	1.36 \pm 0.06	1.92 \pm 0.15	2.23 \pm 0.12
% FAGOC.	16.82	27.56	20.57	22.38

0,5/0,1	0.10 \pm 0.02	0.53 \pm 0.05	1.14 \pm 0.06	1.46 \pm 0.01
0,5/0,1 P	-0.47 \pm 0.25	-0.34 \pm 0.09	-0.10 \pm 0.11	0.30 \pm 0.07
% FAGOC.	72.46	86.20	94.11	93.08

2/0,5	-0.30 \pm 0.18	0.15 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04	0.28 \pm 0.13
2/0,5 P	-0.52 \pm 0.15	-0.56 \pm 0.07	-0.65 \pm 0.01	-0.96 \pm 0.05
% FAGOC.	67.64	80.05	88.25	94.11

4/1	-0.43 \pm 0.17	-1.20 \pm 0.09	-1.93 \pm 0.03	-2.40 \pm 0.12
4/1 P	-1.10 \pm 0.04	-2.22 \pm 0.13	-3.25 \pm 0.11	-3.66 \pm 0.32
% FAGOC.	78.62	90.45	95.21	94.51

8/1,5	-0.94 \pm 0.32	-1.76 \pm 0.25	-2.33 \pm 0.24	-2.56 \pm 0.14
8/1,5 P	-2.24 \pm 0.24	-3.10 \pm 0	-3.63 \pm 0.07	-3.80 \pm 0.11
% FAGOC.	94.99	95.43	94.99	93.97

12/2,5	-1.33 \pm 0.08	-1.96 \pm 0.04	-2.57 \pm 0.07	-2.77 \pm 0.06
12/2,5 P	-2.73 \pm 0.18	-3.53 \pm 0.15	-3.79 \pm 0.03	-4.06 \pm 0.03
% FAGOC.	96.02	97.31	93.97	94.87

Tabla 10. Diferencias entre el tiempo t y $t=0$ en el \log_{10} del número de bacterias viables (medias \pm D.E.) y porcentajes de muerte fagocítica de Streptococcus pneumoniae (serotipo 9) control y tratadas con PMN y con las concentraciones de cefotaxima expresadas en la tabla.

TIEMPO (h)	1	2	3	4
C	0.80 \pm 0.08	1.50 \pm 0.15	2.02 \pm 0.16	2.34 \pm 0.07
C P	0.72 \pm 0.24	1.36 \pm 0.06	1.92 \pm 0.15	2.23 \pm 0.12
% FAGOC.	16.82	27.56	20.57	22.38

0,5	0.50 \pm 0.03	1.00 \pm 0.09	1.34 \pm 0.12	1.51 \pm 0.20
0,5 P	-0.13 \pm 0.03	0.03 \pm 0.06	0.31 \pm 0.18	0.53 \pm 0.33
% FAGOC.	76.56	89.29	90.67	89.53

2	-0.13 \pm 0.04	-0.48 \pm 0.01	-0.63 \pm 0.11	-1.07 \pm 0.18
2 P	-0.62 \pm 0.03	-0.96 \pm 0.04	-1.43 \pm 0.10	-2.01 \pm 0.30
% FAGOC.	67.64	66.89	84.15	88.52

4	-0.16 \pm 0.01	-0.64 \pm 0.07	-0.96 \pm 0.04	-1.34 \pm 0.18
4 P	-0.86 \pm 0.08	-1.46 \pm 0.06	-1.72 \pm 0.11	-2.37 \pm 0.30
% FAGOC.	80.05	84.86	82.62	90.67

8	-0.20 \pm 0.02	-0.56 \pm 0.01	-0.96 \pm 0.03	-1.37 \pm 0.05
8 P	-0.77 \pm 0.14	-1.36 \pm 0.01	-1.75 \pm 0.11	-2.25 \pm 0.06
% FAGOC.	73.09	84.15	83.78	86.32

12	-0.51 \pm 0.10	-0.88 \pm 0.10	-1.21 \pm 0.08	-1.62 \pm 0.08
12 P	-0.82 \pm 0.06	-1.54 \pm 0.10	-1.96 \pm 0.10	-2.49 \pm 0.18
% FAGOC.	51.82	78.12	82.22	86.21

Tabla 11. Efecto de la actividad antimicrobiana de amoxicilina, amoxicilina/clavulánico y cefotaxima por si solas y en combinación con PMN en la eliminación del serotipo 3 de Streptococcus pneumoniae. Los resultados se expresan como medias (\pm D.E) en la reducción del número de bacterias viables (Log_{10} cfu/ml) respecto a los controles en la cuarta hora del ensayo.

Efecto de los PMN (A)	Concentración antibiótica $\mu\text{g/ml}$	Efecto antibiótico	Efecto A + B	Efecto conjunto
AMOXICILINA				
0,07* \pm 0,45	0,25	3,60 \pm 0,34	3,60	4,77 \pm 0,33
	4	4,23 \pm 0,33	4,23	4,95 \pm 0,30
	12	4,65 \pm 0,34	4,65	5,64 \pm 0,30
AMOX/CLAV				
0,07* \pm 0,45	0,25	3,76 \pm 0,32	3,76	4,27 \pm 0,33
	4	4,35 \pm 0,42	4,35	5,01 \pm 0,39
	12	4,70 \pm 0,36	4,70	5,51 \pm 0,35
CEFOTAXIMA				
0,07* \pm 0,45	0,25	3,24 \pm 0,31	3,24	3,55 \pm 0,38
	4	3,58 \pm 0,33	3,58	4,09 \pm 0,33
	12	3,93 \pm 0,35	3,93	4,27 \pm 0,33

* Efecto no significativo ($p < 0,05$)

Tabla 12. Efecto de la actividad antimicrobiana de amoxicilina, amoxicilina/clavulánico y cefotaxima por sí solas y en combinación con PMN en la eliminación del serotipo 6 de *S. pneumoniae*. Los resultados se expresan como medias (\pm D.E) en la reducción del número de bacterias viables (Log_{10} cfu/ml) respecto a los controles en la cuarta hora del ensayo.

Efecto de los PMN (A)	Concentración antibiótica $\mu\text{g/ml}$	Efecto antibiótico	Efecto A + B	Efecto conjunto
AMOXICILINA				
$0,38 \pm 0,42$	0,25	$1,56 \pm 0,20$	$1,94 \pm 0,62$	$4,05 \pm 0,26$
	4	$4,19 \pm 0,11$	$4,57 \pm 0,53$	$6,92 \pm 0,30$
	12	$5,67 \pm 0,11$	$6,05 \pm 0,53$	*
AMOX/CLAV				
$0,38 \pm 0,42$	0,25	$3,15 \pm 0,11$	$3,53 \pm 0,53$	$4,81 \pm 0,17$
	4	$4,51 \pm 0,13$	$4,89 \pm 0,55$	$6,30 \pm 0,18$
	12	$5,18 \pm 0,21$	$5,56 \pm 0,63$	$6,87 \pm 0,14$
CEFOTAXIMA				
$0,38 \pm 0,42$	0,25	$1,38 \pm 0,16$	$1,76 \pm 0,58$	$3,55 \pm 0,11$
	4	$4,91 \pm 0,18$	$5,29 \pm 0,60$	$7,04 \pm 0,11$
	12	$5,23 \pm 0,16$	$5,61 \pm 0,58$	$7,15 \pm 0,07$

* Fuera de escala

Tabla 13. Efecto de la actividad antimicrobiana de amoxicilina, amoxicilina/clavulánico y cefotaxima por si solas y en combinación con PMN en la eliminación del serotipo 9 de Streptococcus pneumoniae. Los resultados se expresan como medias (\pm D.E.) en la reducción del número de bacterias viables (Log_{10} cfu/ml) respecto a los controles en la cuarta hora del ensayo.

Efecto de los PMN (A)	Concentración antibiótica $\mu\text{g/ml}$	Efecto antibiótico	Efecto A + B	Efecto conjunto
AMOXICILINA				
0,11 \pm 0,19	0,25	0,51 \pm 0,14	0,62 \pm 0,33	0,77* \pm 0,24
	4	3,61 \pm 0,15	3,72 \pm 0,34	4,61 \pm 0,15
	12	4,00 \pm 0,13	4,11 \pm 0,32	5,63 \pm 0,13
AMOX/CLAV				
0,11 \pm 0,19	0,25	0,88 \pm 0,08	0,99 \pm 0,27	2,04 \pm 0,14
	4	4,74 \pm 0,19	4,85 \pm 0,38	6,00 \pm 0,39
	12	5,11 \pm 0,13	5,22 \pm 0,32	6,40 \pm 0,10
CEFOTAXIMA				
0,11 \pm 0,19	0,25	0,83 \pm 0,27	0,94 \pm 0,36	1,81 \pm 0,40
	4	3,68 \pm 0,08	3,79 \pm 0,27	4,71 \pm 0,15
	12	3,96 \pm 0,15	4,07 \pm 0,34	4,83 \pm 0,25

* Diferencias no significativas.

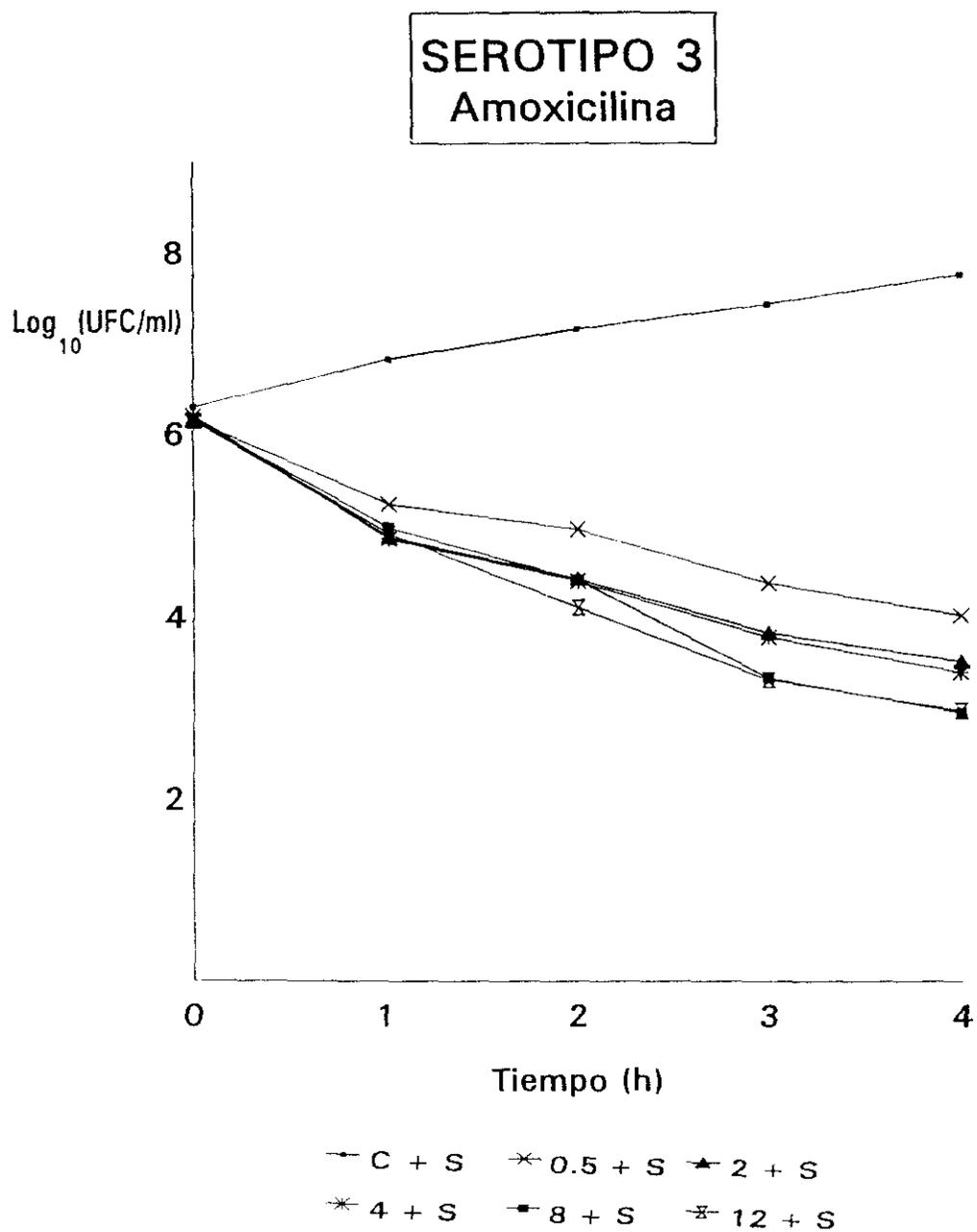


Figura 1. Cinéticas de crecimiento del serotipo 3 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina señaladas.

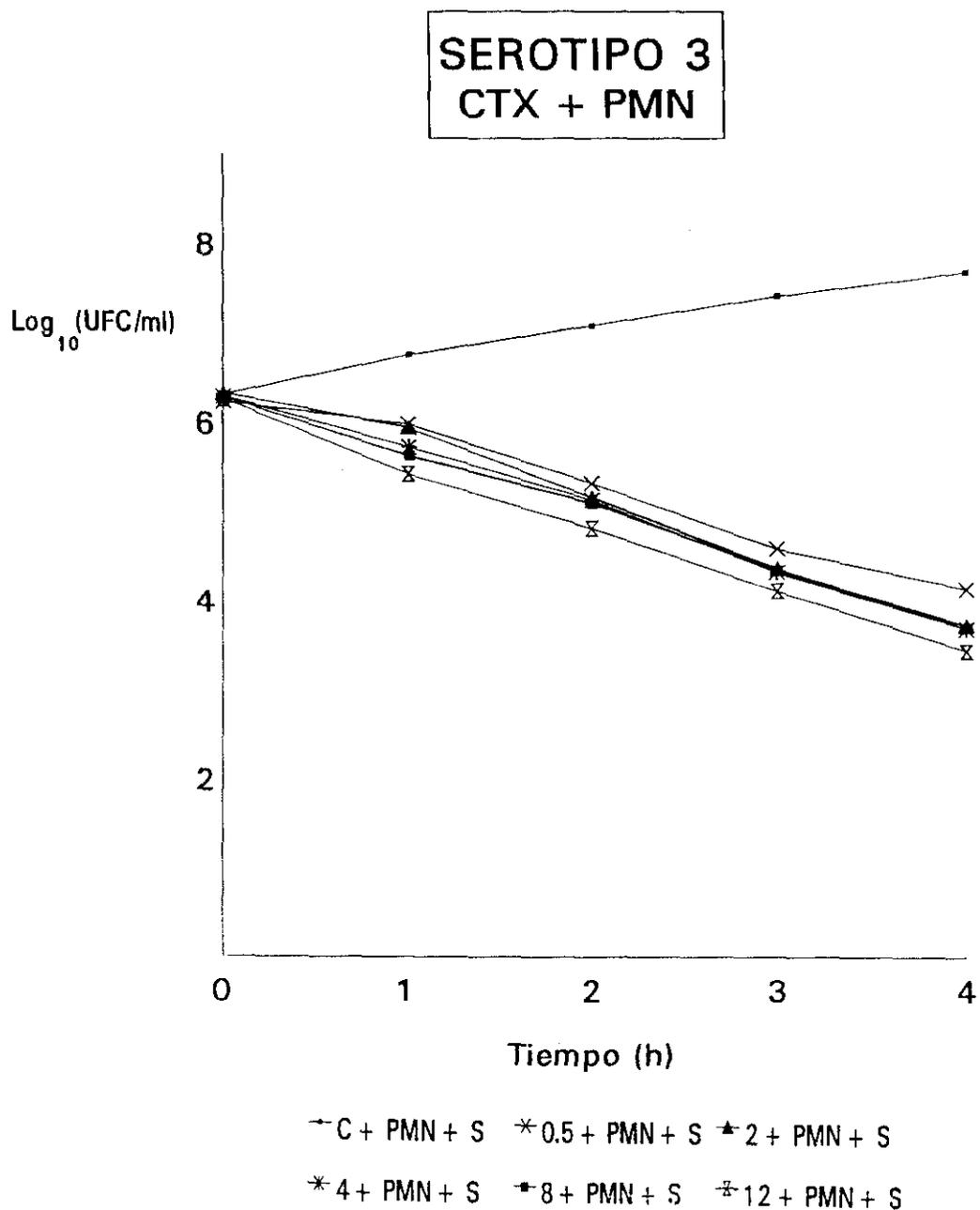


Figura 2. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 3 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina señaladas.

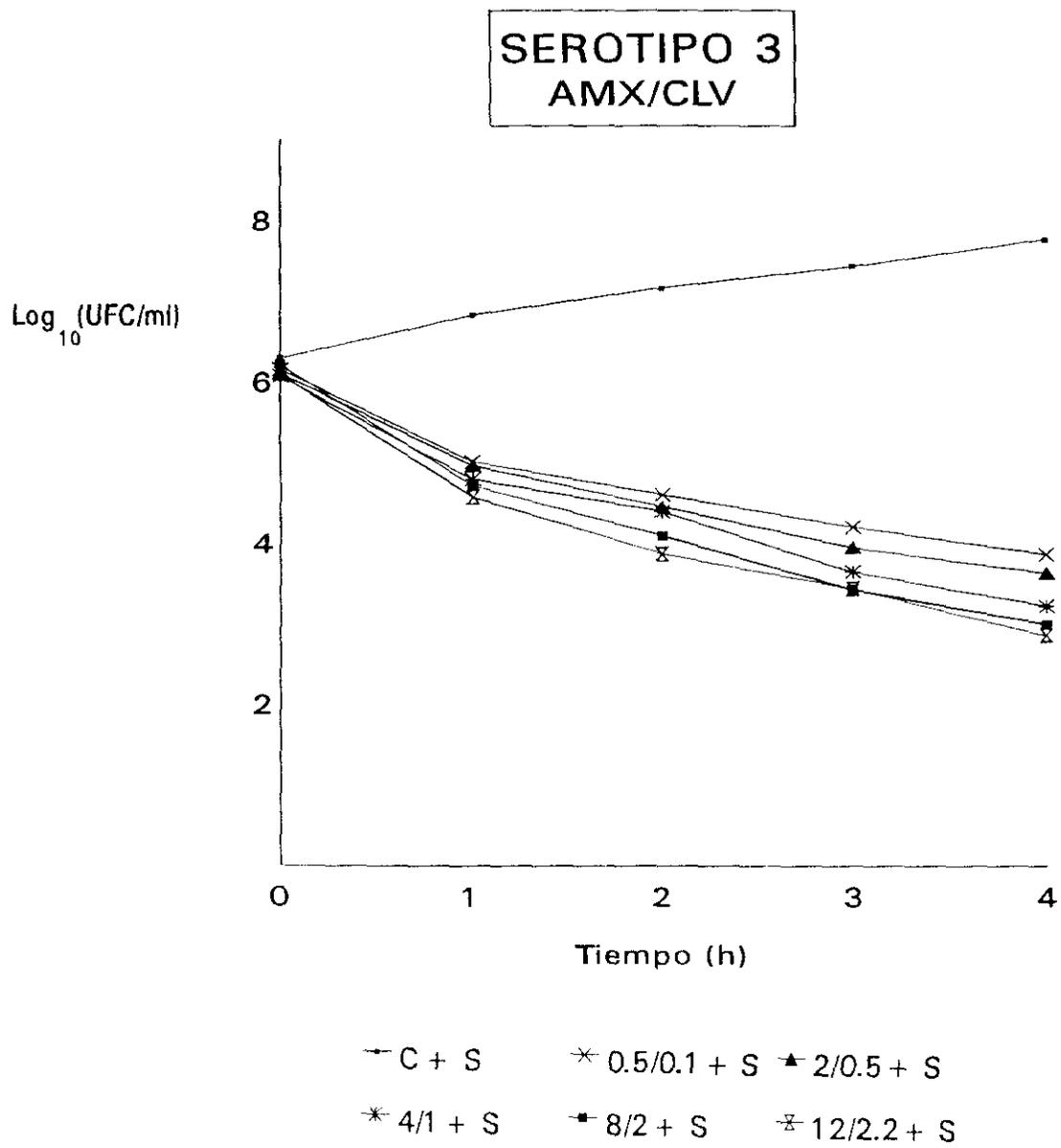


Figura 3. Cinéticas de crecimiento del serotipo 3 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina/clavulánico señaladas.

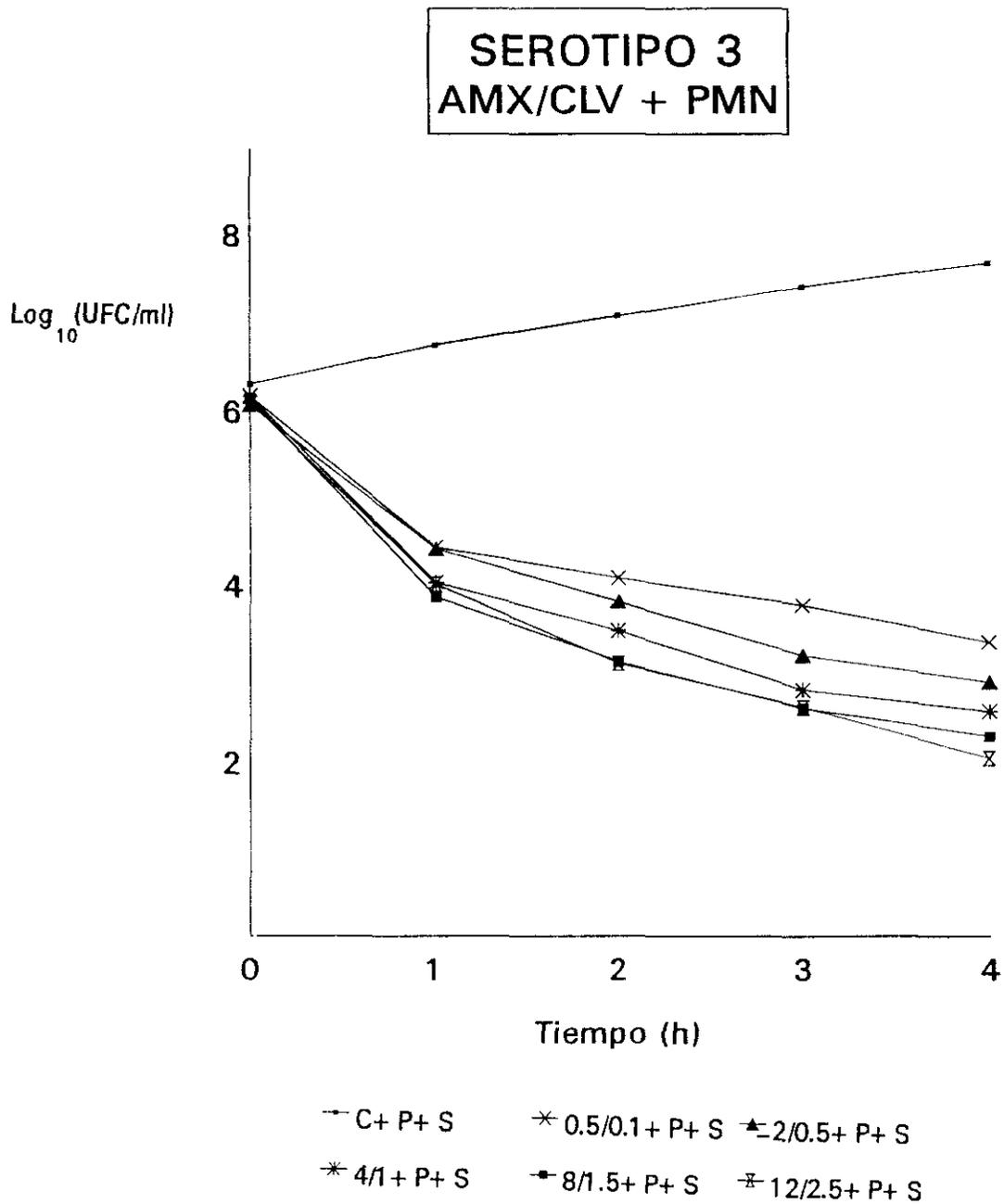


Figura 4. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 3 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina/clavulánico señaladas.

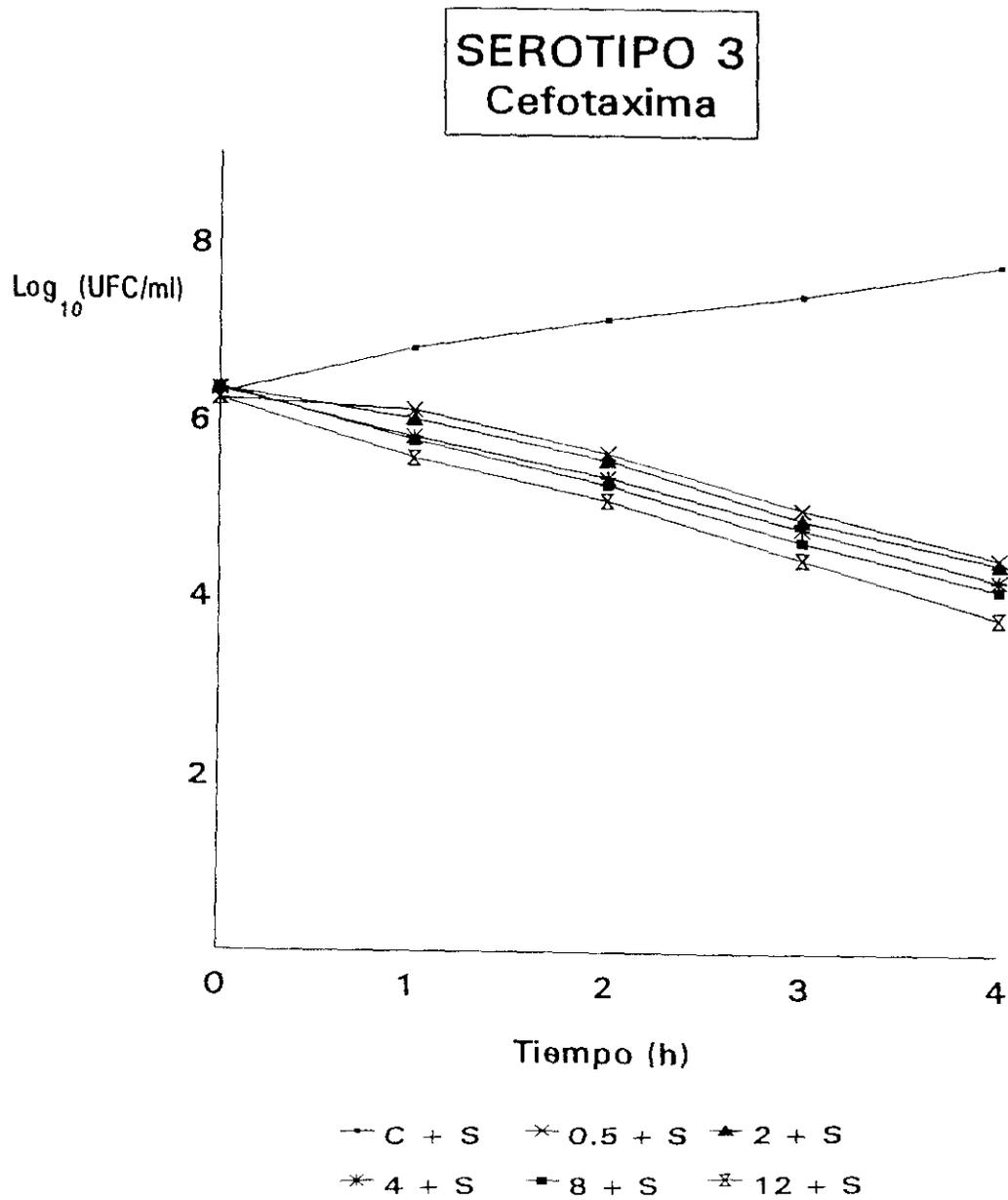


Figura 5. Cinéticas de crecimiento del serotipo 3 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de cefotaxima señaladas.

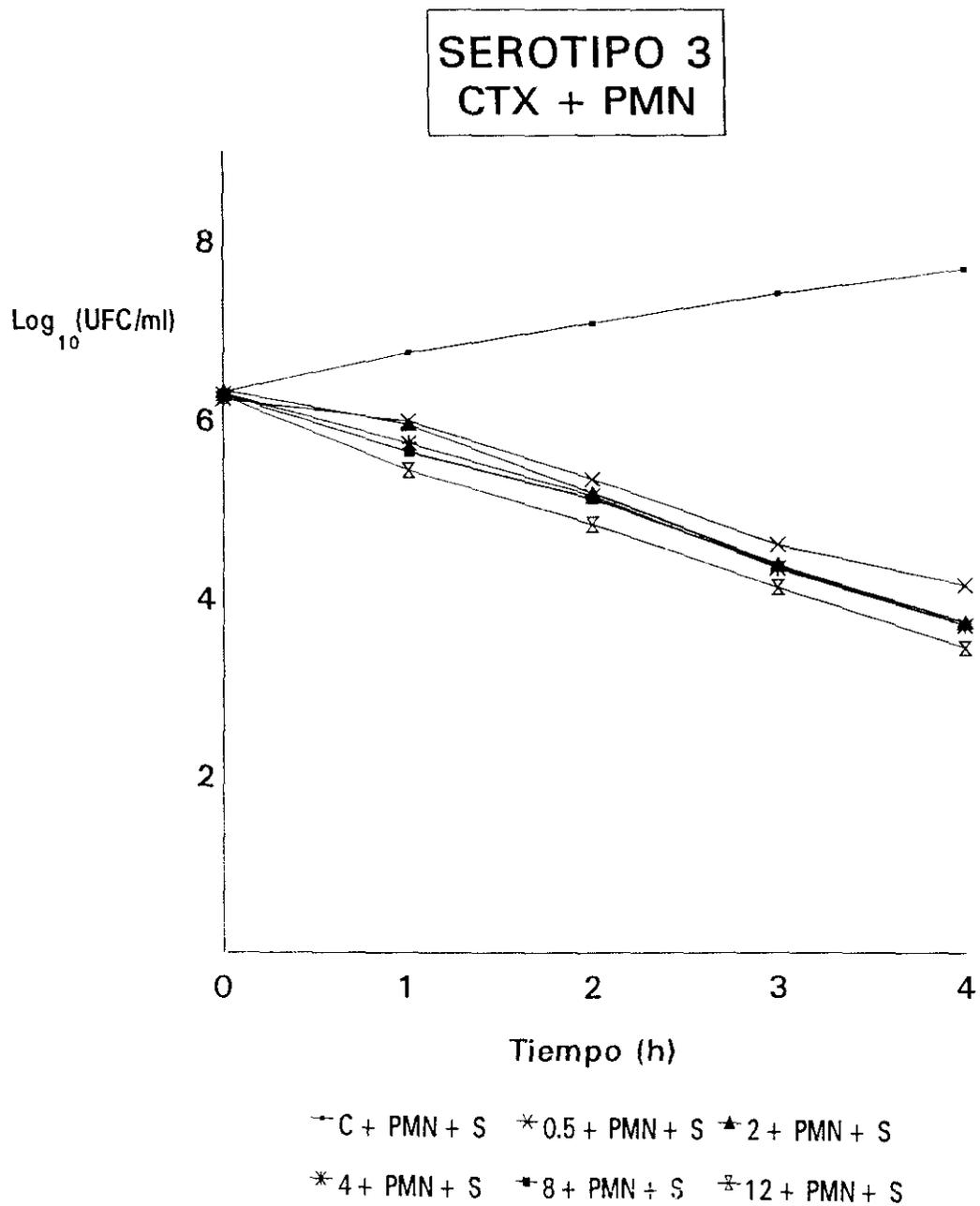


Figura 6. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 3 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de cefotaxima señaladas.

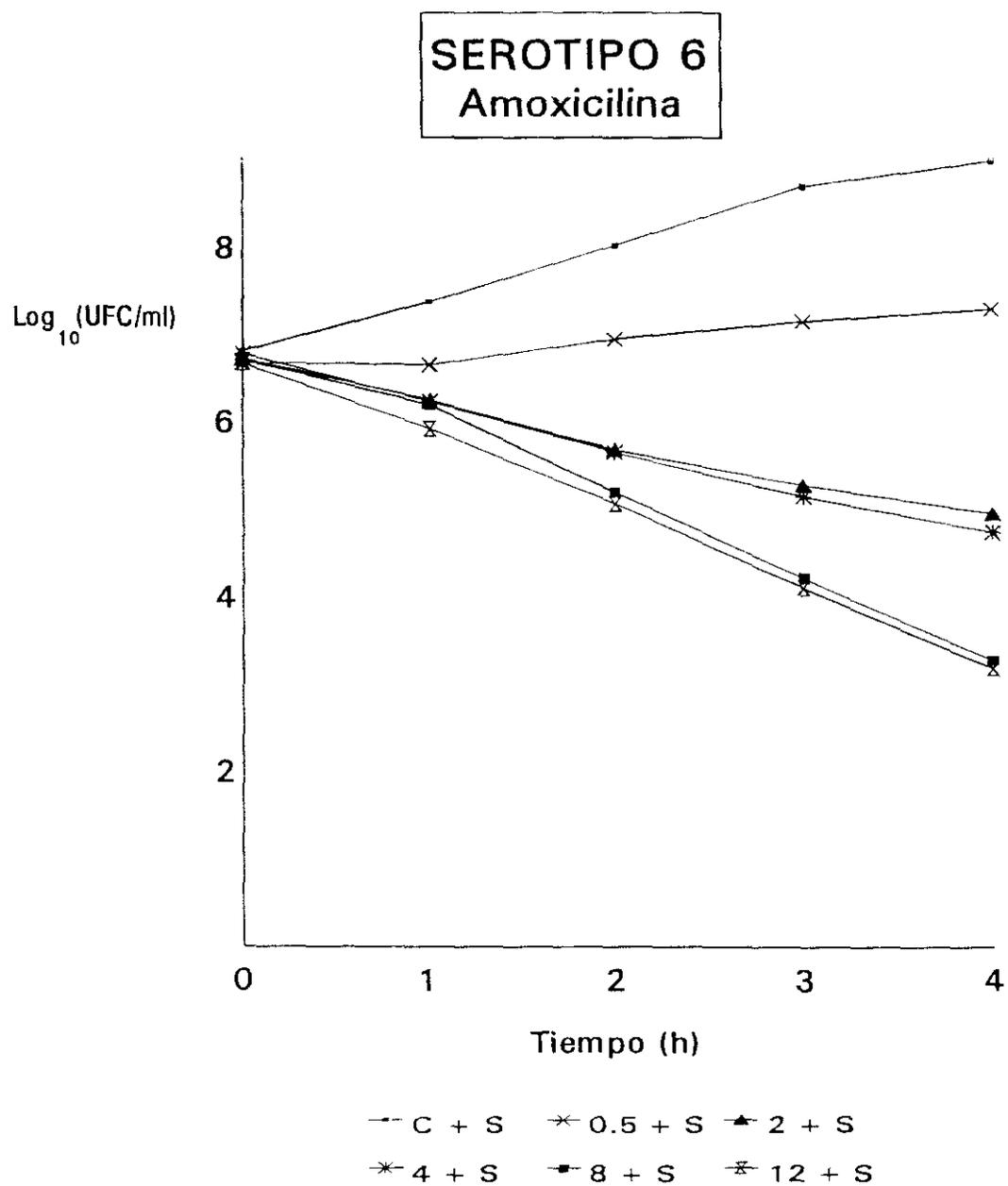


Figura 7. Cinéticas de crecimiento del serotipo 6 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina señaladas.

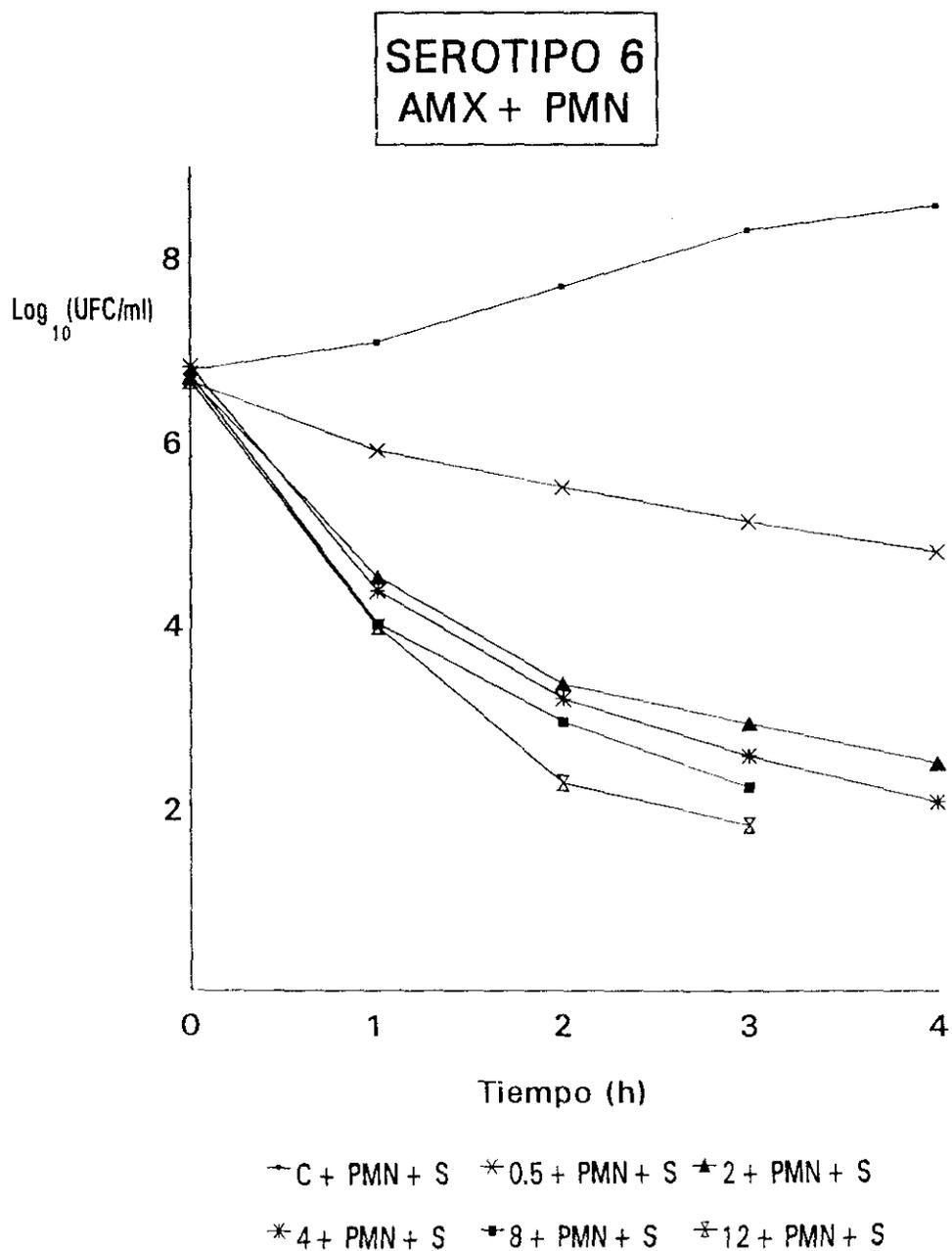


Figura 8. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 6 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina señaladas.

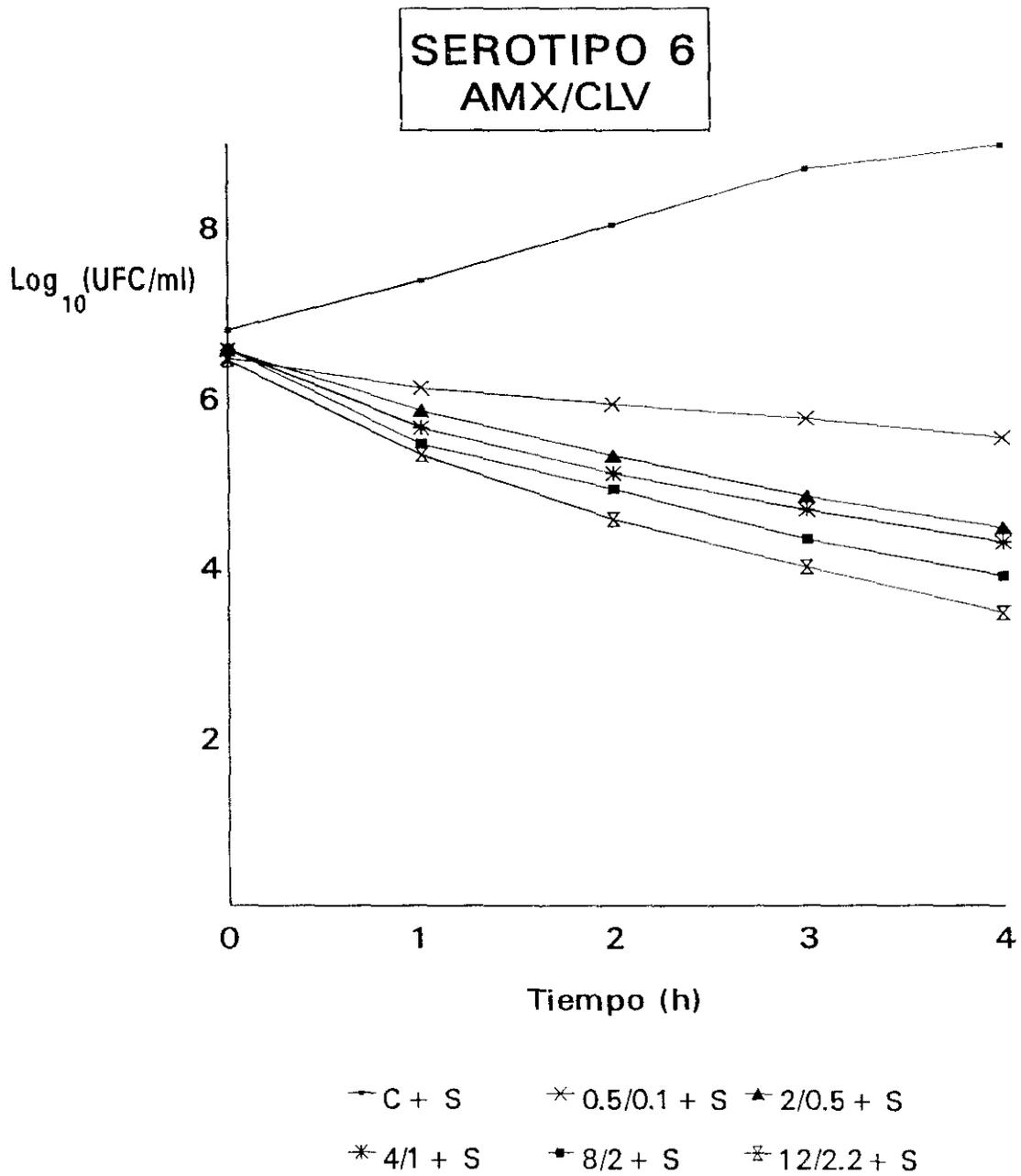


Figura 9. Cinéticas de crecimiento del serotipo 6 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina/clavulánico señaladas.

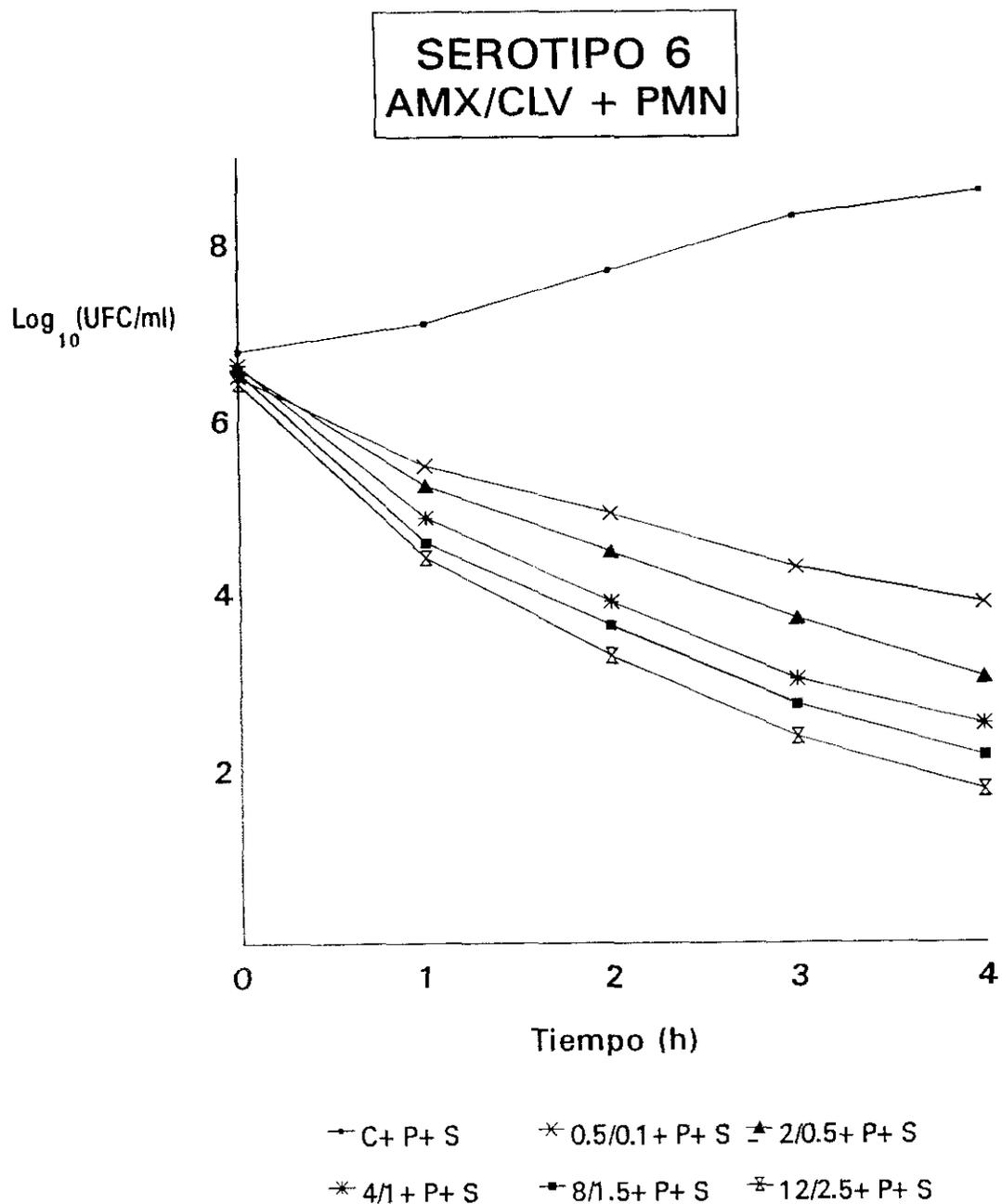


Figura 10. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 6 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina/clavulánico señaladas.

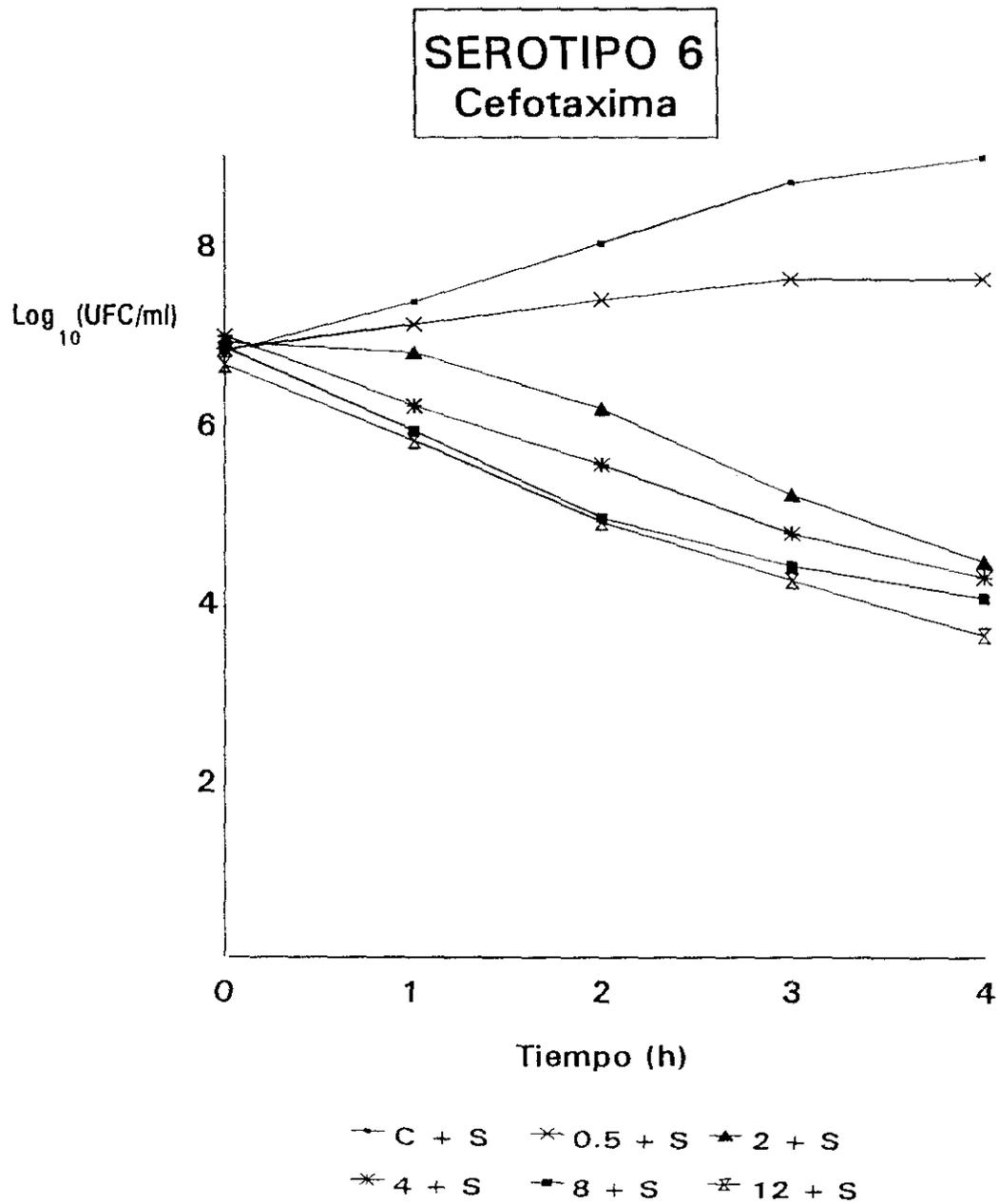


Figura 11. Cinéticas de crecimiento del serotipo 6 de *S. pneumoniae*, controles y tratados con las concentraciones de cefotaxima señaladas.

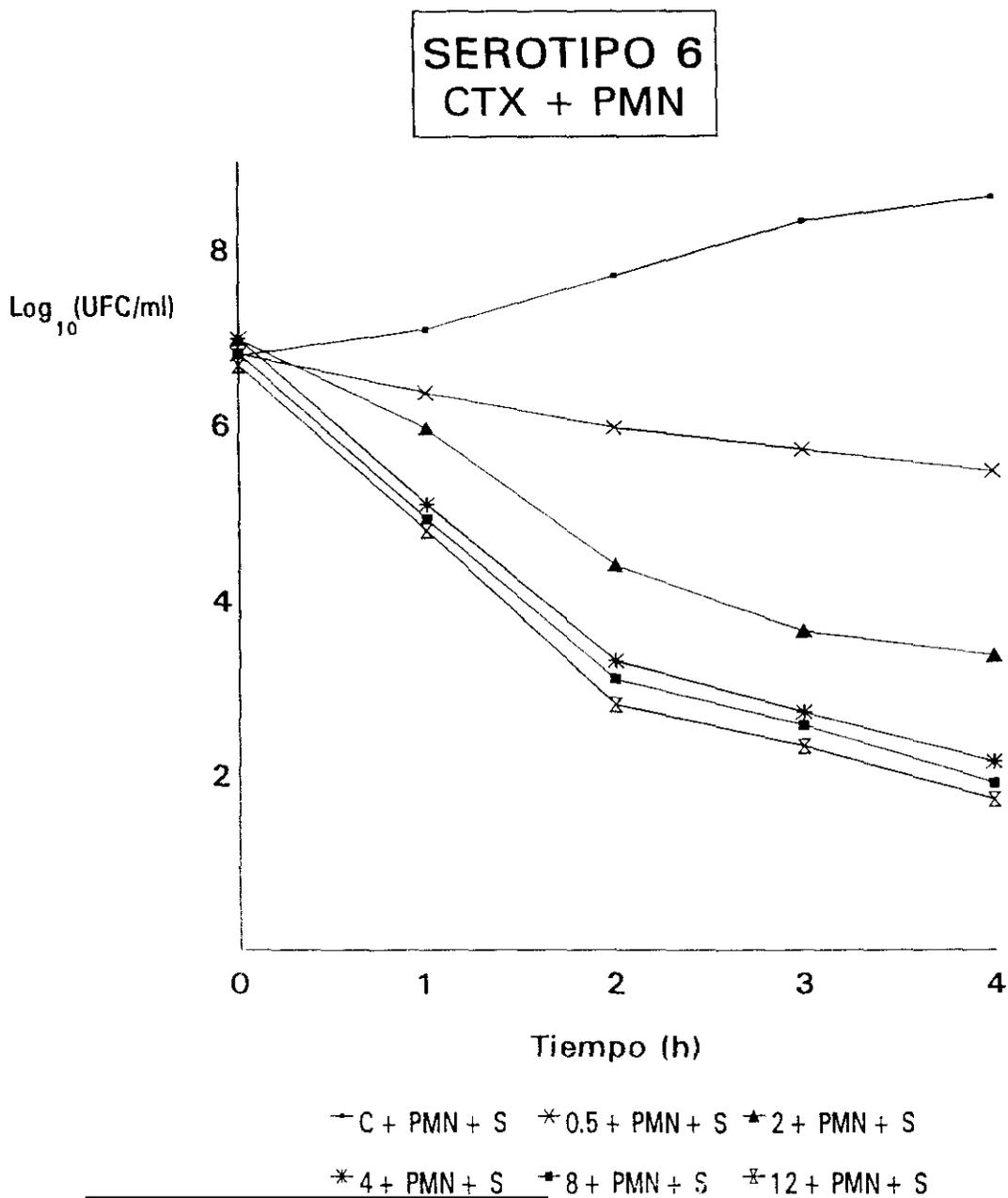


Figura 12. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 6 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de cefotaxima señaladas.

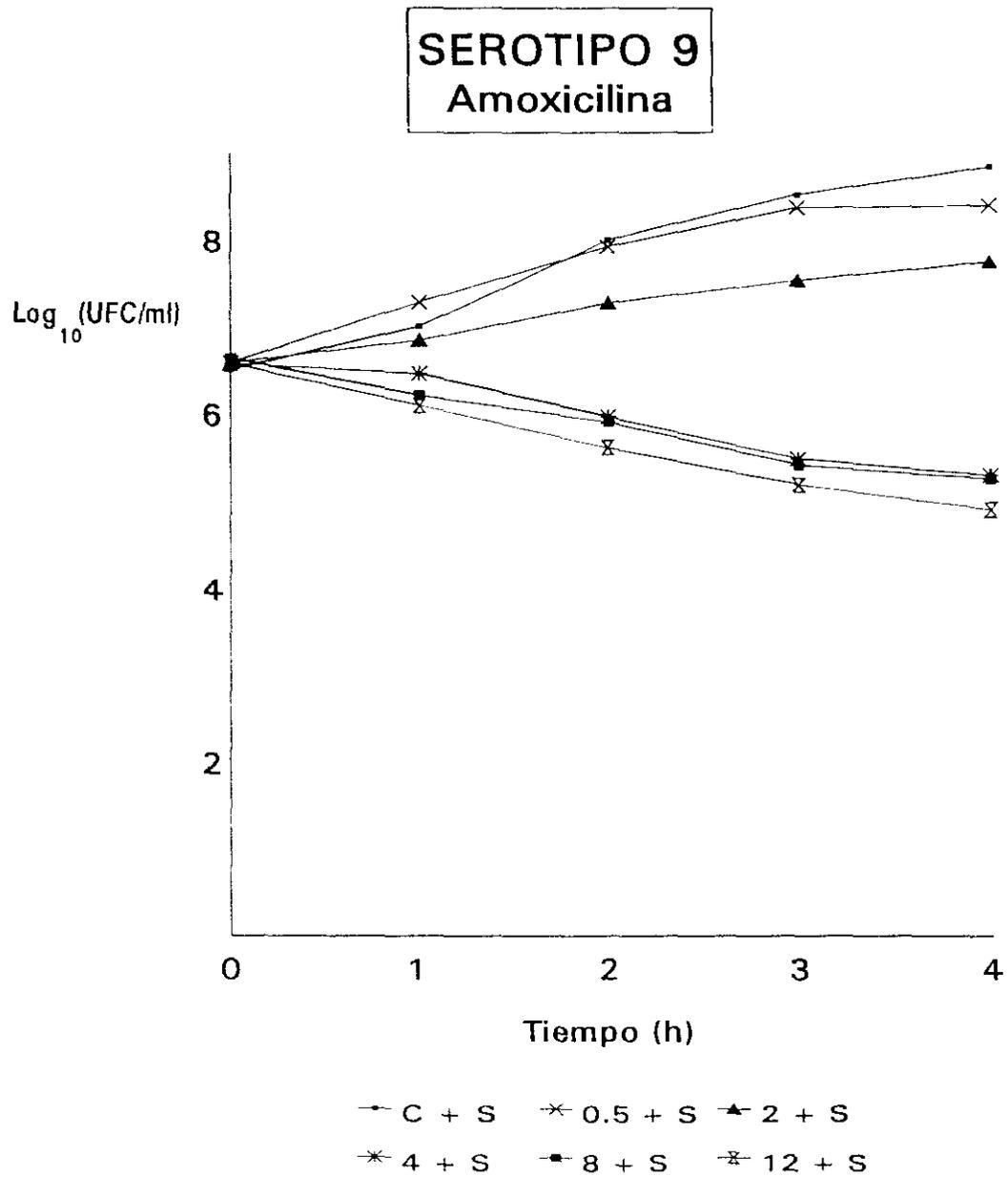


Figura 13. Cinéticas de crecimiento del serotipo 9 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina señaladas.

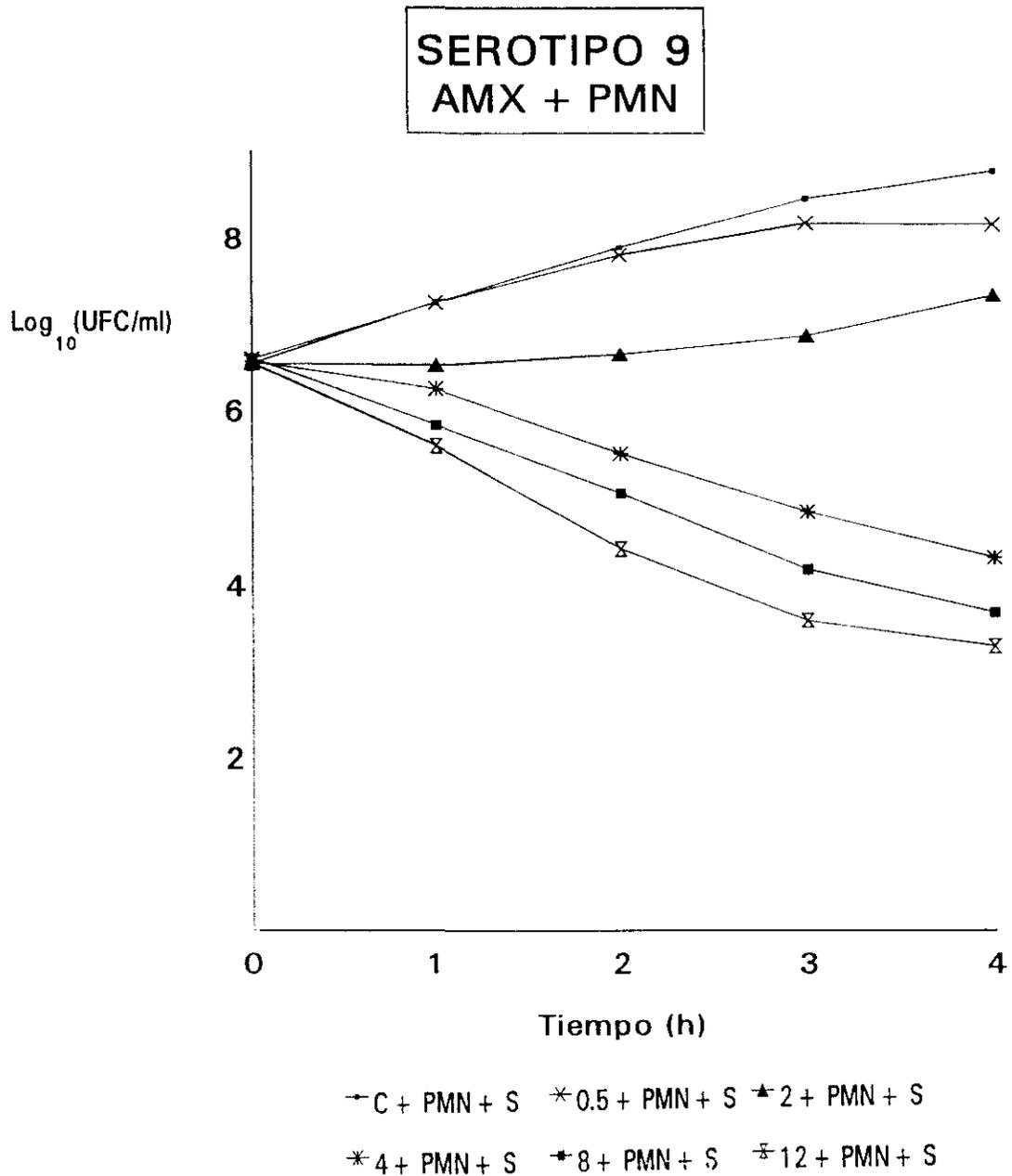


Figura 14. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 9 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina señaladas.

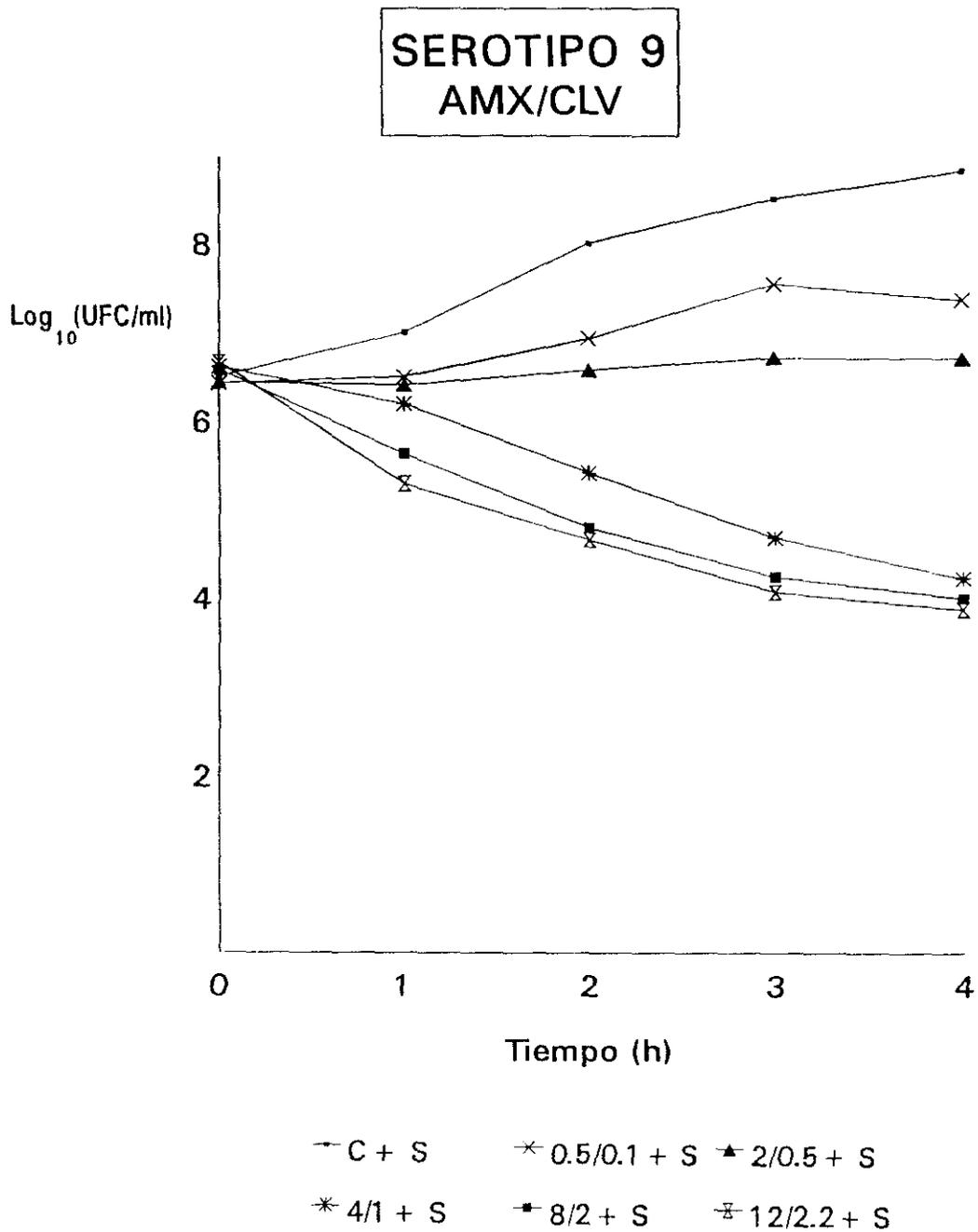


Figura 15. Cinéticas de crecimiento del serotipo 9 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina/clavulánico señaladas.

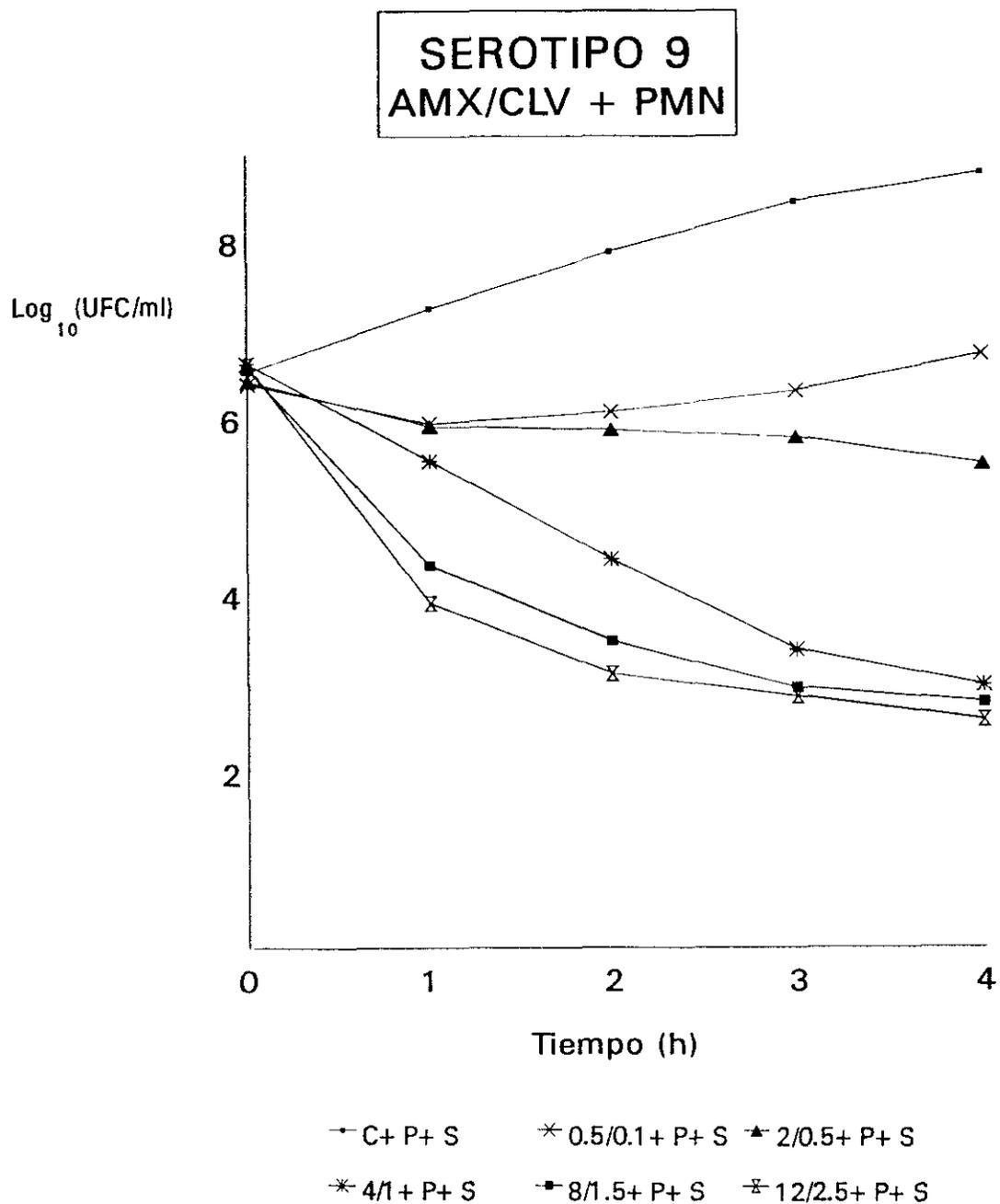


Figura 16. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 9 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de amoxicilina/clavulánico señaladas.

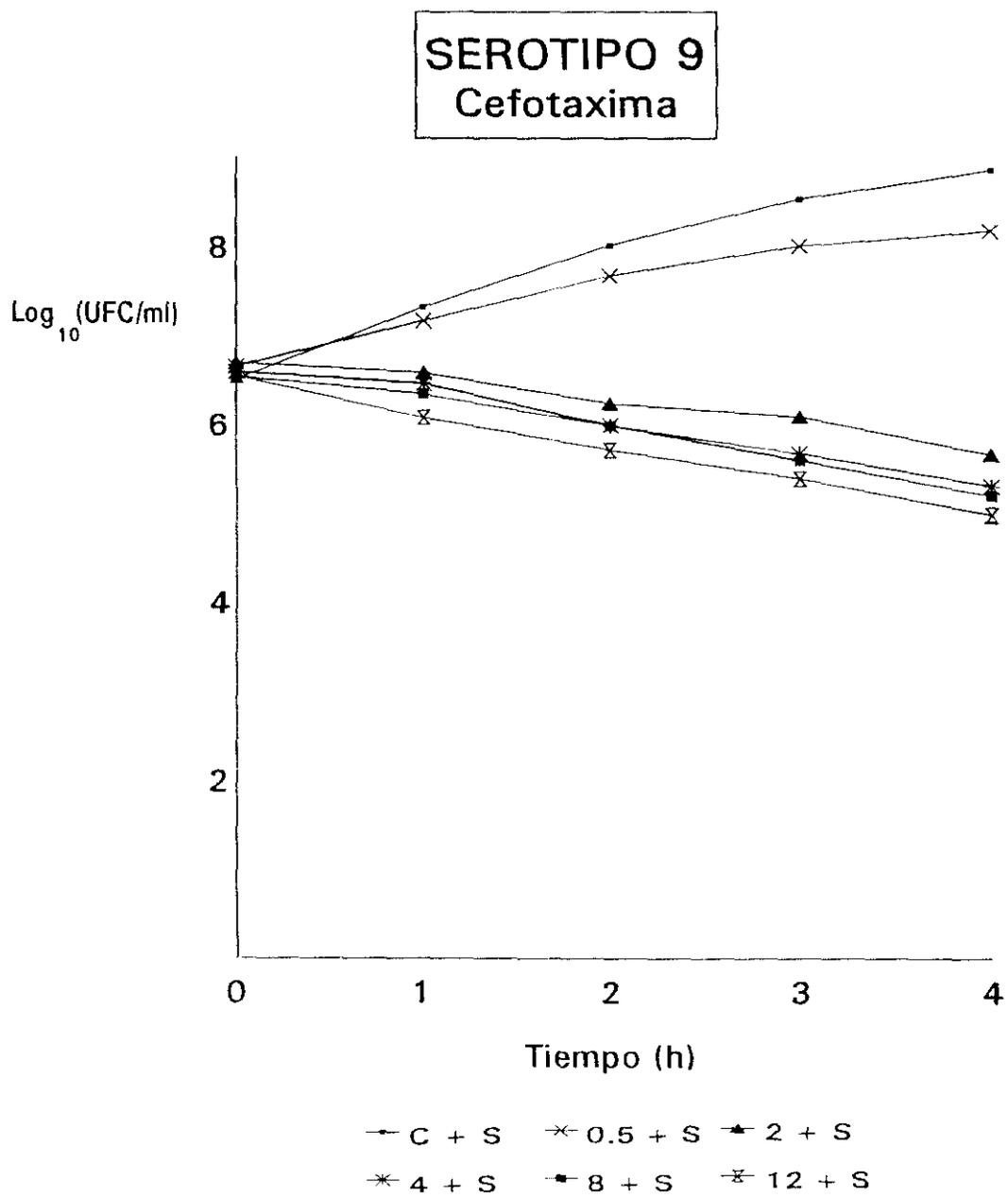


Figura 17. Cinéticas de crecimiento del serotipo 9 de S. pneumoniae controles y tratados con las concentraciones de cefotaxima señaladas.

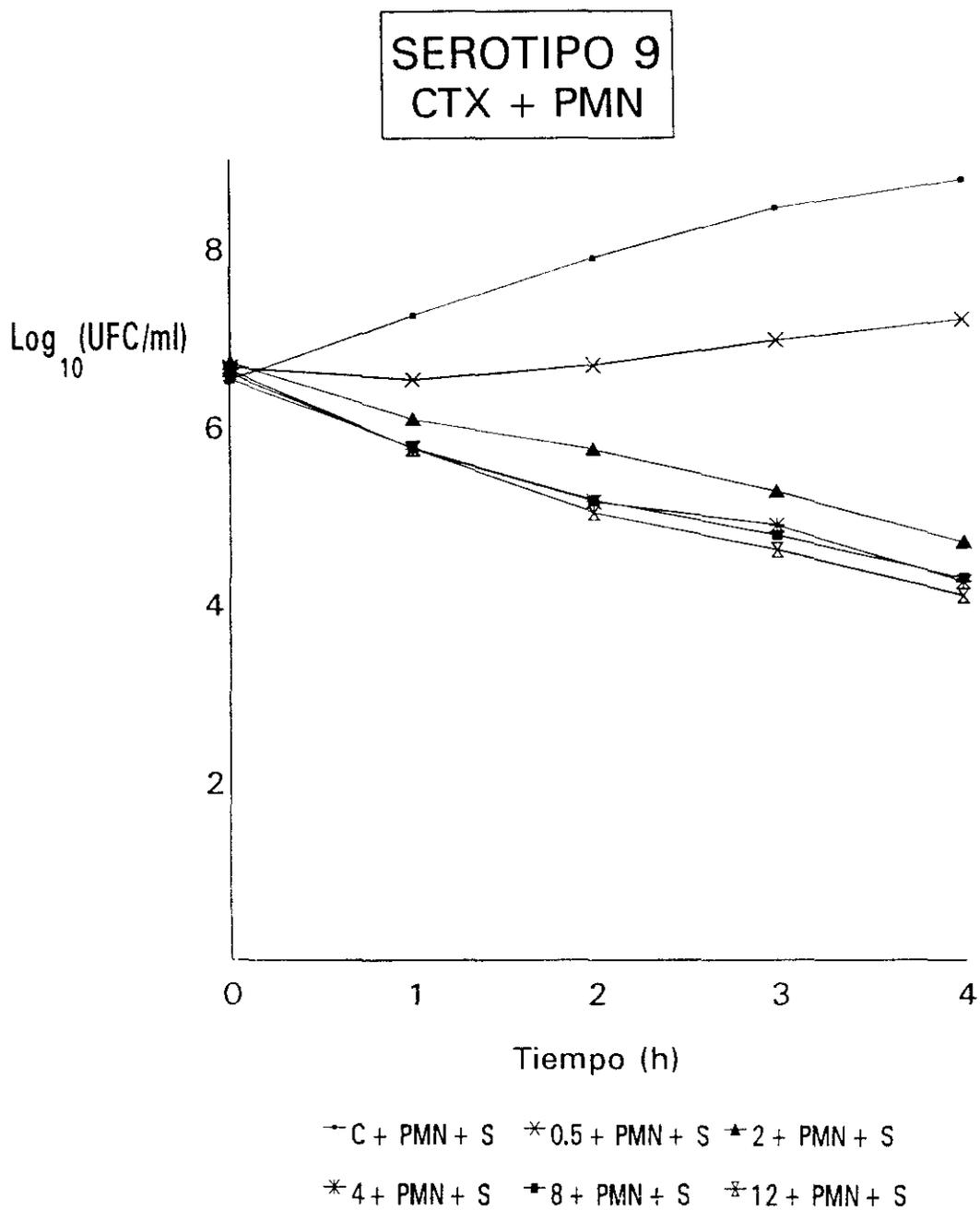


Figura 18. Cinéticas de crecimiento en presencia de PMN del serotipo 9 de S. pneumoniae, controles y tratados con las concentraciones de cefotaxima señaladas.

DISCUSIÓN

1 ANÁLISIS DEL MÉTODO

1.1 Obtención y medición del inóculo

A partir de la dilución de un cultivo bacteriano que permaneció durante toda la noche en crecimiento, y ya en fase estacionaria o de muerte celular, se obtuvo la fase de crecimiento exponencial de las bacterias. También podría haberse conseguido directamente a través de la inoculación, en un medio de cultivo adecuado, de las colonias de neumococos a partir de la placa de agar sangre donde se desarrollaban. Ambos procedimientos podían utilizarse (79), pero dadas las características de nuestro ensayo y la mayor rapidez con que se necesitaba obtener la fase exponencial de las bacterias se optó por el primer método descrito, además se conseguía así una mayor sincronía en el crecimiento y con ello una mayor uniformidad en los resultados.

La concentración bacteriana adecuada se alcanzaba a una determinada medida espectrofotométrica, ambos parámetros se correlacionaron anteriormente mediante la realización de unos controles frente a cada cepa bacteriana, ya que la medida del espectrofotómetro varía en función de la cepa de S. pneumoniae utilizada. En nuestro caso tal variación se debía, fundamentalmente, a la elaboración de diferentes tipos de cápsulas por las bacterias, en otros casos también se producían variaciones en la medida debido a otros procesos como agregación bacteriana o a la producción de células de diferentes tamaños. Este método de medición era, sin duda, más riguroso y objetivo que otros métodos empleados como la escala de Mc Farland (80).

1.2 Extracción de los neutrófilos

Mediante la separación de los PMN por el método descrito se podían conseguir dichas células en un período de tiempo corto (aproximadamente 60

minutos), en comparación con las técnicas que utilizaban gradientes de densidad para separarlos.

El rendimiento en la obtención de células era elevado, y en condiciones ideales se podían conseguir hasta 4×10^6 células/ml de sangre. La pureza obtenida era, sin embargo, mayor con los gradientes de densidad. En nuestro caso los neutrófilos obtenidos no estaban aislados completamente sino que se encontraban mezclados con un pequeño porcentaje de otros tipos de células blancas como son los linfocitos y monocitos, que de todos modos no iban a interferir con los resultados del estudio.

En algunos casos se ha mencionado la posibilidad de que el cloruro amónico, utilizado para lisar los glóbulos rojos, alterase el balance electrolítico de los neutrófilos con la consiguiente pérdida, total o parcial, de alguna de sus funciones. En cualquier caso los efectos causados por el cloruro amónico son reversibles (81) al resuspender las células posteriormente en un medio fisiológico, como es la solución salina de Hank, utilizada en nuestro estudio. Estos inconvenientes no se resuelven, si no que más bien parecen agravarse, cuando utilizamos otros métodos de separación, dado que también se han observado problemas que conducen a la pérdida, en algunos casos irreversible, de alguna función de los PMN al separar estos mediante el uso de polímeros en gradiente de densidad (82-86). La separación mediante el método que seguimos es, por tanto, la menos perjudicial para los neutrófilos.

1.3 Tratamiento antimicrobiano

Para determinar el efecto conjunto de los PMN y los antimicrobianos sobre las bacterias u otros microorganismos había que tener en cuenta que los elementos presentes en el estudio podían interaccionar entre si, de esta forma los resultados obtenidos podían deberse a unos efectos directos antimicrobiano-bacteria o PMN-bacteria, o podíamos observar un resultado final, consecuencia de unas relaciones establecidas entre todos los agentes

implicados en el estudio. Era necesario tener unos ensayos que diferenciases los distintos efectos. Para ello en primer lugar se trató las bacterias con cada uno de los antimicrobianos utilizados en el ensayo. También se analizó el efecto bactericida provocado únicamente por los PMN. Posteriormente las bacterias fueron sometidas a la acción conjunta de los PMN y del antibiótico.

Las concentraciones de antimicrobianos empleadas en el estudio se correspondían con las concentraciones medias obtenidas en el suero de un individuo, tras ser sometido a un régimen de dosificación normal con dichos antibióticos. La dosis de 12 $\mu\text{g/ml}$ era la dosis máxima que se obtenía al ingerir 500 mg de amoxicilina. Con cefotaxima las concentraciones alcanzadas eran similares, aunque debido a la distinta forma de administración el máximo se conseguía más rápidamente. Se tomaron también otras dosis intermedias entre este valor máximo, que representaban otros valores obtenidos en el organismo antes y después de alcanzar dicha concentración máxima.

1.4 Lisis de los neutrófilos

Para lisis los PMN y mantener intactas las bacterias, que eran el parámetro que se iba a determinar, podía recurrirse, como en nuestro caso, al choque osmótico por dilución en agua destilada a temperatura ambiente, del medio de cultivo con los PMN y las bacterias (87). También podía emplearse de forma efectiva un choque osmótico a 0°C (88). Existen otros métodos para conseguir una lisis más completa de los neutrófilos, aunque no son tan inocuos para las bacterias y pueden alterar sus funciones. La utilización de agua destilada a un pH elevado podía alcanzar la lisis de un 95,5% de los PMN (89) y se ha comprobado que valores elevados del pH del agua hasta valores de 11 no producían daños significativos en bacterias como S. aureus y E. coli. En el caso de S. pneumoniae no se ha comprobado esto y además el pH influye en la eliminación de los neumococos que han sido

tratados con antibióticos β -lactámicos, de forma que niveles bajos de pH protegían a la bacteria de la lisis provocada por estos antibióticos (90). Por ello se eligió un método que lisara un número menor de PMN, pero que no interfiriese en la eliminación de las bacterias provocada por los antimicrobianos.

2 ESTUDIO DE LOS RESULTADOS

2.1 ANÁLISIS DE LAS CMI_s.

La acción que causan los antibióticos β -lactámicos sobre las bacterias se debe a los efectos que provocan en la pared bacteriana. Estos inhiben la reacción de transpeptidación, evitando así la formación de los enlaces peptídicos que se producirían en la pared y dando como resultado una pared mucho más laxa, con pérdida de estabilidad y originando una célula que está expuesta a las variaciones osmóticas del medio extracelular. Conociendo este hecho, la hipótesis más probable para explicar la muerte celular de la bacteria causada por los β -lactámicos, postulaba que esta era causada por la rotura de las membranas de la bacteria debido a la elevada presión osmótica ejercida por el citoplasma (91). Tomasz (91) sugirió que al menos en neumococos, donde el llevaba a cabo sus estudios, el tratamiento β -lactámico también interactuaba con un inhibidor de la actividad autolítica de la bacteria, lo que provocaría la actividad incontrolada de dichos enzimas autolíticos de la pared celular, produciéndose así la lisis del neumococo.

Puede aparecer una resistencia frente a este tipo de antibióticos por producción de β -lactamasas, pero no es el caso que nos ocupa, puesto que no se han descrito cepas de *Streptococcus pneumoniae* productoras de estas enzimas (92). Debido a las características de la pared celular de bacterias grampositivas no es necesario que el antibiótico β -lactámico penetre al interior de la célula para llevar a cabo su acción, por lo que en estas bacterias no se

producen resistencias frente a estos antibióticos debido a mutaciones que alteren su permeabilidad celular. La única posibilidad de explicar la variación existente en las CMI de las tres cepas de Streptococcus pneumoniae estudiadas (tabla 1), se basa en un tercer tipo de mecanismo que provoca resistencia frente a estos antimicrobianos, que es la alteración en las PBPs de la bacteria (93-95). Las alteraciones en las PBPs, producidas por sucesivas y múltiples mutaciones, crean nuevas proteínas con diferente afinidad por el antibiótico, lo que en algunos casos va a otorgar una cierta resistencia a la bacteria (96, 97), en el caso de que la afinidad halla disminuido tras la mutación. Aislados clínicos de alta resistencia a las penicilinas muestran cambios en sus PBPs 1a, 2a, 2b o 2x, o combinaciones de estas proteínas alteradas (94, 98, 99). Debido a estas modificaciones la acción de un mismo antibiótico β -lactámico sobre una especie bacteriana puede variar, haciendo que varíen las CMI frente a ese antibiótico. Estas mutaciones son fácilmente transmisibles de una cepa a otra mediante transformación, lo que provoca un aumento de las cepas bacterianas de alta resistencia a los antibióticos β -lactámicos.

La acción que ejercen los antibióticos β -lactámicos también puede ser evitada, en cierto grado, cuando la bacteria es tolerante a dicho antibiótico. En el fenómeno de la tolerancia existe una característica común, y es que la CMI de la bacteria hacia el antibiótico no varía, pero el efecto bactericida del antibiótico si lo hace, de tal forma que la bacteria no tiene el mismo porcentaje de muerte que el organismo no tolerante (100 - 103).

La tolerancia se explica por mutaciones que aparecen en los sistemas autolíticos de la bacteria (75, 103, 104, 105). El organismo puede ser deficiente en estos sistemas (105) o puede tener niveles normales de actividad autolítica pero tener modificadas las dianas autolíticas (106), con lo que también aparecen bacterias relativamente resistentes a los efectos líticos de los antibióticos β -lactámicos. El antibiótico impide el desarrollo de la

bacteria tolerante, debido a que no entran en acción estos sistemas autolíticos.

2.2 ANÁLISIS DEL EFECTO BACTERICIDA DE LOS PMNs.

El efecto que producen los PMN sobre los neumococos es bastante variable debido en gran parte, a los diferentes tipos de cápsulas que pueden presentar estas bacterias. Los organismos no encapsulados son, a menudo, ingeridos y eliminados por los neutrófilos incluso en ausencia de complemento. Las bacterias encapsuladas, en general y no sólo los neumococos, impiden la fagocitosis y son más virulentas que las cepas no encapsuladas (107). Los serotipos que cuentan con grandes cápsulas polisacáridicas, son más difíciles de fagocitar y por lo tanto de ser eliminadas por los PMN.

Además de las cápsulas existen otros factores que van a interactuar con la fagocitosis haciéndola más difícil. En S. aureus un componente de su superficie externa, la proteína A, impide la opsonización por parte de los factores del complemento, retrasando así la fagocitosis por los leucocitos. Algunos antibióticos reducen la cantidad de proteína A en la superficie celular con lo que aumentan la fagocitosis y muerte de S. aureus (23, 108). Algunas cepas de S. pyogenes que poseen proteína M en su superficie son más resistentes a la fagocitosis. También la capacidad antifagocítica de esta proteína parece deberse a las características que la hacen impedir la opsonización de la bacteria. Los antibióticos como la clindamicina (109, 110, 111), aumentan la fagocitosis, debido a que provocan la desaparición de esta proteína. Dicha eliminación permitiría una mayor unión del factor de complemento C3 a la superficie bacteriana, aumentando la opsonización y la posterior fagocitosis. S. pneumoniae también cuenta con proteínas en su superficie externa como la Psp A, que es un importante factor de virulencia en esta bacteria.

En nuestro caso, el éxito de los PMN para eliminar las bacterias por si mismos, es decir sin adición de ningún tipo de antibiótico al medio, fue distinto dependiendo de la cepa de S. pneumoniae utilizada para llevar a cabo el ensayo. Mientras que la cepa de serotipo 3, sensible a penicilinas, no se mostró significativamente sensible a la acción del suero y de los PMN, las otras dos cepas si fueron fagocitadas y eliminadas de forma significativa, aunque en distinto grado cada una de ellas. A diferencia de los serotipos 6 y 9, la cepa de neumococo de serotipo 3, sensible a penicilinas, contaba con una cápsula mucosa muy grande y fenotípicamente distinta de las anteriores que iba a constituir una de las causas para su difícil eliminación fagocítica por parte de los PMN.

Las diferencias fenotípicas que existían entre los serotipos 6 y 9 no eran tan evidentes como las encontradas con la cepa anterior, pero si se encontró una diferente eliminación causada por los PMN. Ambas cepas fueron capturadas y eliminadas de forma significativa por los fagocitos en presencia de suero humano normal, pero la cepa de serotipo 6 era eliminada de forma más eficaz que la de serotipo 9. Estas diferencias, además de deberse a los distintos tipos de cápsulas de cada serotipo, se debía al mayor o menor grado de permisividad que presenten estas bacterias a ser opsonizadas por los factores séricos, como se ha mencionado anteriormente.

Hasta ahora se habían identificado 85 serotipos distintos de S. pneumoniae en cuanto a la antigenicidad de su cápsula polisacáridica, algunos de ellos eran fácilmente eliminados por el propio organismo por lo que relativamente pocos de estos serotipos iban a causar infecciones (70). Además no todas las cepas cuentan con los mecanismos de adherencia, virulencia, etc. necesarios para colonizar el medio donde podrían causar la infección. Aunque la cápsula polisacáridica existente en S. pneumoniae fue reconocida como un elemento esencial necesario para que esta bacteria causara virulencia (112) y que determinaba, en gran medida, el grado en que

iba a ser fagocitada, algunas cepas no encapsuladas podían causar infecciones en animales desprovistos de granulocitos (113), lo que indicaba que había otros factores neumocócicos implicados en las infecciones causadas por esta bacteria tales como la Psp A, las neumolisinas y las autolisinas.

2.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO

2.3.1 Estudio del serotipo 3

2.4.1.1 Tratamiento con amoxicilina

El tratamiento de esta cepa con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina representaba un aumento de aproximadamente 16 veces la CMI sobre la propia CMI de la bacteria, es decir, se partía de concentraciones bajas de antibiótico para un régimen normal de dosificación, pero que eran ya difícilmente toleradas por esta cepa bacteriana.

Con concentraciones bajas de antibiótico la cinética de crecimiento bacteriana disminuyó y continuó haciéndolo según aumentábamos la concentración de amoxicilina, por lo que en principio se observaba un efecto de concentración dependencia en la eliminación de la bacteria por parte del antimicrobiano. Este efecto tuvo lugar sólo a partir de la segunda hora, en horas anteriores las diferencias no fueron significativas. A partir de 8 $\mu\text{g/ml}$ la reducción del número de bacterias parecía detenerse. Efectos similares en la reducción del número de *S. pneumoniae* al aumentar la concentración de amoxicilina y por tanto un efecto dosis-dependiente, se podían encontrar en los trabajos de J. Liñares y cols (76), y Pankuch (114), aunque en estos casos las concentraciones de antibiótico utilizadas estaban más cercanas a la CMI de la bacteria. Con dosis superiores de amoxicilina y después de 6 horas de tratamiento no se obtenían diferencias en las cinéticas de crecimiento de

las bacterias (114).

Algunos autores propusieron diferentes mecanismos de acción en cuanto a la actividad bactericida de los distintos antibióticos β -lactámicos (115). Las penicilinas se caracterizarían por un aumento inicial en la muerte de los microorganismos. Este aumento sólo se producía hasta una determinada concentración de antibiótico, alcanzada esta, no se conseguían reducciones significativas en la eliminación de bacterias, aunque aumentase la concentración de antibiótico. Las cefalosporinas incrementaban la actividad bactericida en un intervalo mayor de concentraciones. Al contrario de esta hipótesis, otros autores (116 - 120) propusieron que las cefalosporinas tenían una actuación similar a las penicilinas y la actividad bactericida que provocaban no era dependiente de la concentración de antibiótico. Algunos antimicrobianos provocan el denominado efecto Eagle (121), observado sobre todo con β -lactámicos cuando actúan sobre determinadas especies y cepas de estafilococos y estreptococos (122). Este efecto paradójico consiste en que altas concentraciones de antibiótico producen una disminución en la eliminación bacteriana. También se observa de forma frecuente al comprobar la CMI de una bacteria, cuando con determinadas concentraciones de antibiótico se produce una turbidez en el medio que a concentraciones menores no existe.

Nuestros resultados se ajustaban más a los de los autores que encuentran, hasta ciertos límites, un efecto de concentración dependencia entre la concentración antibiótica y la eliminación bacteriana (76, 114), pero considerando que en nuestro caso, a diferencia de los trabajos citados, la concentración señalada como máxima para alcanzar la estabilización del efecto bactericida del antibiótico era mayor.

2.3.1.2 Tratamiento con amoxicilina / clavulánico

El comportamiento era similar al que se conseguía solamente con la

amoxicilina. Igual que anteriormente también encontramos una concentración-dependencia en la eliminación de las bacterias, que era mayor con dosis bajas de antibiótico y que se fue reduciendo al aumentar la concentración.

La mayor diferencia que se encontró frente a los resultados obtenidos con la amoxicilina sola, tenía lugar en las primeras horas del ensayo y a dosis elevadas, donde la combinación de ambos fármacos eliminó un mayor número de bacterias. Ambos juntos tenían un efecto más rápido, aunque posteriormente, al final del ensayo, los valores se asemejaron a los obtenidos sólo con amoxicilina. La diferente sensibilidad encontrada entre amoxicilina y amoxicilina/clavulánico cuando actuaban frente a esta bacteria sensible a β -lactámicos, y no productora de β -lactamasas era escasa, y podía ser debida a la distinta afinidad de estos antimicrobianos por cada una de las PBPs de la bacteria, lo que provocaba una acción más completa, actuando sobre más PBPs, cuando además de amoxicilina añadíamos ácido clavulánico.

Las diferencias halladas entre amoxicilina y el tratamiento conjunto de amoxicilina y clavulánico no fueron elevadas. De acuerdo con esto otros autores (114) tampoco encontraron diferencias significativas en los niveles bactericidas de amoxicilina después de añadir a esta ácido clavulánico.

2.3.1.3 Tratamiento con cefotaxima

La cefotaxima redujo el número de bacterias de forma progresiva al aumentar la concentración de antibiótico. Este efecto se observó mejor en las últimas horas del ensayo (fig. 5). Nuestros resultados se ajustaron a las propuestas de Shah et al (115), en cuanto a la clasificación de la actividad bactericida de las cefalosporinas. Estas moléculas incrementarían la eliminación de las bacterias en un rango mayor de concentraciones que en el caso de las penicilinas. En nuestro estudio a concentraciones de 12 $\mu\text{g/ml}$ todavía no se había estabilizado el efecto del antibiótico sobre la bacteria, a diferencia de lo que ocurría con la amoxicilina.

La cefotaxima se mostró menos rápida y eficaz que la amoxicilina en la eliminación de las bacterias. Aunque ambas moléculas tenían la misma CMI frente a esta cepa de neumococo y el resultado final tras 24 horas de incubación con cada antimicrobiano fue el mismo, con un seguimiento de la cinética bacteriana punto a punto como ocurría en este estudio, y no sólo a las 20 - 24 horas como en el caso de la determinación de la CMI, se podían observar estas diferencias en la evolución del número de bacterias, que no se ponían de manifiesto con el análisis de la CMI.

En la mayoría de los estudios "in vitro" (76, 114, 123, 124) amoxicilina y penicilina se muestran como los antibióticos β -lactámicos más activos en la eliminación de S. pneumoniae, aunque cefotaxima y otras cefalosporinas sean también eficaces "in vivo" en el tratamiento de infecciones neumocócicas graves (125 - 127). Liñares et al (76) demostraron, igual que ocurría en nuestro caso, una mayor disminución en la cinética de crecimiento de S.pneumoniae tratado con amoxicilina y penicilina que los tratados con cefotaxima y ceftriaxona, tanto frente a cepas de serotipo 3, sensibles a penicilina y con CMIs similares para todos los antibióticos, como frente a cepas de serotipo 6, de resistencia intermedia a penicilinas y con CMIs más altas para las cefalosporinas.

Muñoz et al (128) estudiaron los mecanismos de resistencia en S. pneumoniae (en una cepa de serotipo 6) y demostraron que las alteraciones en las PBPs 1A y 2X eran las responsables de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, de forma que la diferencia en la afinidad de las cefalosporinas y penicilinas por estas proteínas iba a dar lugar a una diferente actuación de ambos tipos de antimicrobianos, aun cuando sus mecanismos de acción eran muy similares.

2.3.2 Estudio del serotipo 6

2.3.2.1 Tratamiento con amoxicilina

El efecto que produjo la amoxicilina en esta cepa de resistencia intermedia fue escaso a bajas dosis. Con una concentración de $0.5 \mu\text{g/ml}$ de antibiótico y sin la acción de los PMN el número de bacterias aumentó ligeramente aunque esta dosis de partida fuese algo superior a la concentración mínima inhibitoria. Esto se explicaba por que el cálculo de la CMI y de las curvas de letalidad se llevaron a cabo en condiciones experimentales diferentes, lo que podía provocar que el crecimiento de la bacteria fuera distinto en ambos casos. Las curvas bacterianas, a diferencia de la CMI, se realizaron en un medio con agitación y el propio medio de cultivo utilizado era distinto en un caso que en otro.

Con dosis mayores de antibiótico se producía una rápida disminución del número de bacterias, hasta la concentración de $8 \mu\text{g/ml}$ donde se estabilizaba. El número de bacterias disminuyó a niveles muy bajos en la cuarta hora de ensayo, inferiores incluso a los observados en la cepa sensible. Este efecto tan marcado en cepas menos sensibles al antibiótico que en otras que lo eran más, también se podía observar en otros estudios realizados con neumococos que eran sometidos a la acción de imipenem (78). Esto se debía únicamente a la cepa bacteriana empleada en el ensayo, era una característica de cada bacteria, puesto que en el trabajo realizado con imipenem no se observó dicho efecto con todas las cepas. En nuestro caso el serotipo 6 era más resistente a la acción del antibiótico que el de serotipo 3, su CMI era mayor y se necesitaba una mayor concentración antimicrobiana para comenzar a reducir su número, pero posteriormente, después de alcanzada dicha concentración las bacterias morían muy rápidamente, más incluso que las sensibles. Ambos tipos de bacterias eran eliminadas totalmente tras 24 horas de tratamiento antibiótico con dosis superiores a la CMI, pero la

bacteria de serotipo 6 disminuía de una forma más rápida. Aunque el antimicrobiano tuviera menos afinidad por las PBPs de esta cepa, el efecto que causaba era más grave para la bacteria, o bien los mecanismos autolíticos que se ponían en marcha en esta cepa, después del contacto con el antibiótico, eran más eficientes que en el serotipo 3. Este hecho también ocurre en presencia de PMN, el serotipo 6 fue eliminado más rápidamente que los otros estudiados. Se tenía una bacteria intrínsecamente más débil, aunque era más resistente a los antibióticos β -lactámicos que el serotipo anterior. Esta característica también se ponía de manifiesto en otros estudios con antibióticos como el imipenem (78).

El aumento en la eliminación de bacterias en relación a la dosis de antimicrobiano, fue similar al comprobado por otros autores, observándose una concentración-dependencia (76, 114, 115), al igual que en la cepa anterior, hasta alcanzarse unos niveles de 8 $\mu\text{g/ml}$.

2.4.2.2 Tratamiento con amoxicilina/clavulánico

En este caso cuanto mayor era la dosis de la combinación antimicrobiana suministrada al medio, mayor era la reducción del número de bacterias, y a diferencia de los casos anteriores esta disminución no se estabilizó con las concentraciones estudiadas.

El tratamiento con amoxicilina-ácido clavulánico, en principio, consiguió una mayor eliminación de neumococos que la amoxicilina. Aunque "in vitro" no se han comprobado efectos similares, Smith et al (129) trabajando en modelos experimentales con ratas encontraron que el clavulánico aumento el efecto bactericida de la amoxicilina sobre los neumococos. Las diferencias encontradas entre ambos antimicrobianos se fueron igualando al aumentar la concentración, hasta que finalmente con 8 y 12 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina se obtuvo la mayor eliminación de bacterias. La inversión del efecto bactericida con elevadas dosis de ácido clavulánico, se debía probablemente a la

disminución del pH provocado por las elevadas dosis del ácido, lo que provocaba en S.pneumoniae y en otras especies bacterianas como B. subtilis y streptococcus del grupo B la detención de efecto bacteriolítico provocado por los antibióticos β -lactámicos (90, 130).

2.3.2.3 Tratamiento con cefotaxima

Con bajas concentraciones de antibiótico (0,5 $\mu\text{g/ml}$) las bacterias crecían durante poco tiempo, a partir de la tercera hora de ensayo las bacterias entraban en una fase de crecimiento estacionaria y posteriormente en la fase de muerte bacteriana.

Con concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$ el número de bacterias disminuía drásticamente, por debajo incluso de los niveles observados con amoxicilina en la hora cuarta de ensayo (aunque esta cepa tenía una CMI más baja frente a cefotaxima que frente a amoxicilina). En este mismo tiempo y con concentraciones superiores a 4 $\mu\text{g/ml}$, amoxicilina fue de nuevo más eficaz que cefotaxima.

En la última concentración de antibiótico ensayada comenzó a observarse una saturación en la cinética de muerte bacteriana, (fig. 11). El efecto de concentración-dependencia era similar en este caso al obtenido con amoxicilina, a diferencia de lo propuesto por Shah (115), y en concordancia con las tesis de otros autores (116, 120) que proponían una actividad bactericida similar para penicilinas y cefalosporinas. Por tanto, para estudiar este efecto bactericida en relación a la concentración de antibiótico que empleamos, no sólo hay que tener en cuenta el tipo y la cantidad de antibiótico empleado, sino que también existen variaciones dependiendo de la naturaleza de las propias cepas bacterianas que utilizamos. De esta forma, los resultados contradictorios que se observan en los estudios realizados hasta ahora, pueden deberse a que estos estudios no se realizan con unos microorganismos y unas técnicas estandar, lo que introduce una mayor

variabilidad y los resultados no son por tanto concluyentes.

2.3.3 Estudio del serotipo 9

2.3.3.1 Tratamiento con amoxicilina

En este caso, hasta alcanzar la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina no se iniciaba la reducción del número de bacterias. Igual que en anteriores ocasiones, esta disminución comenzaba a concentraciones superiores a la CMI obtenida para esta cepa.

La cinética bacteriana, igual que en casos anteriores, disminuía progresivamente al aumentar la dosis de antimicrobiano, existía también una dosis-dependencia. Si bien ahora no se observó una estabilización en la reducción bacteriana a las concentraciones de antibiótico ensayadas, como ocurría con las otras cepas de neumococos. Esto se debía, probablemente, a que con esta bacteria más resistente a β -lactámicos las concentraciones de amoxicilina utilizadas estaban más cercanas a la CMI y todavía no se había conseguido el efecto máximo. Este podríamos observarlo si aumentásemos la concentración de amoxicilina.

2.3.3.2 Tratamiento con amoxicilina/clavulánico

El tratamiento con amoxicilina y ácido clavulánico mejoró el efecto bactericida observado con amoxicilina. La CMI fue igual en ambos casos, pero el crecimiento con la combinación antibiótica era menor. En otros trabajos con neumococos (131) también se encontraban, algunas veces, efectos ligeramente diferentes entre estos antimicrobianos usados solos o en combinación. Se había comprobado "in vivo" que el ácido clavulánico podía incrementar el efecto bactericida de amoxicilina sobre algunas cepas de *S. pneumoniae* (129), aunque este efecto era muy pequeño. El papel del clavulánico no se pudo explicar como inactivador de β -lactamasas, puesto que

los neumococos no tenían este tipo de enzimas bacterianas, sino por su actuación sobre otras PBP diferentes de las que actuaba la amoxicilina. En este sentido también podíamos encontrar en la bibliografía un incremento en la eliminación de Staphylococcus aureus no productores de penicilinas al añadir ácido clavulánico a la amoxicilina (132).

2.3.3.3 Tratamiento con cefotaxima

Con menores concentraciones de antimicrobiano que las utilizadas en el caso de la amoxicilina ya se obtuvo una reducción en el número de colonias, pero sin embargo con dosis mayores de 2 $\mu\text{g/ml}$ los efectos eran prácticamente iguales.

En ninguno de los dos casos se consiguió la respuesta máxima debido a que la concentración de antibiótico necesaria para alcanzarla era mayor de la máxima que se empleó en el estudio, ya que en este caso la cepa era más resistente.

En general se conseguía un efecto mayor con amoxicilina y en algunos casos con la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico, ambos consiguieron resultados mejores que la cefotaxima. Otros autores también obtienen datos similares (76). Asimismo, Pankuch (114) comparando el efecto de amoxicilina con otras cefalosporinas y penicilinas llegó a la conclusión de que amoxicilina era el antibiótico más activo en la eliminación de S. pneumoniae.

2.4 EFECTO CONJUNTO DE PMN Y ANTIMICROBIANOS

2.4.1 Serotipo 3

El tratamiento de neumococos con amoxicilina y en presencia de PMN

redujo el número de bacterias respecto a las cinéticas de crecimiento de bacterias que no estaban en presencia de PMN. Sin embargo, los microorganismos control sin antibiótico no fueron eliminados significativamente por los neutrófilos. Por ello, la presencia continua de ambos factores fue más eficaz que la suma del efecto provocado por los PMN y por el antibiótico por separado, esto es, existía un sinergismo en la eliminación de las bacterias.

Cuanta mayor era la dosis de antibiótico, la acción conjunta del fármaco y los PMN eliminaban un número mayor de bacterias, hasta un determinado punto en que se estabilizó, que se encontraba a una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina. Sin embargo, la dosis de amoxicilina que favorecía más el efecto de los PMN fue la de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, que era donde se producían los mayores porcentajes de fagocitosis y donde existía un mayor sinergismo entre ambos factores. No había por tanto, una relación directa entre mayores dosis de antibiótico y mejor actuación de los PMN, incluso el porcentaje de fagocitosis era mayor con bajas concentraciones de antibiótico, lo que indicaba que con una lesión bacteriana suficientemente pequeña los PMN actuaban en las mejores condiciones. En algunos estudios se observó que el efecto estimulador que producían los antibióticos β -lactámicos a los PMN se encontraba a concentraciones subinhibitorias (133) y este efecto no se incrementaba con dosis mayores de antibiótico (134). En otros casos (135), la actividad bactericida óptima de los neutrófilos fue encontrada a concentraciones suprainhibitorias de cefdinir. En nuestro caso se encontró el mayor efecto estimulador de los PMN con la menor dosis de antimicrobiano utilizada, aunque no se pudo comprobar el efecto de la amoxicilina a unas dosis subinhibitorias, ya que la mínima concentración de antibiótico empleada en nuestro estudio quedaba por encima de la CMI de esta cepa sensible.

El mecanismo exacto por el cual algunos β -lactámicos producen un incremento de la fagocitosis no es totalmente conocido y el daño que causan

a cada tipo de bacteria no va a influir de la misma forma en su interacción con los PMN. Así carbenicilina, ticarcilina, azlocilina y piperacilina aumentaban la adhesividad a sustrato de los neutrófilos pero no tenían efecto en su quimiotaxis ni en su fagocitosis (136 - 138). El cefamandol aumenta la fagocitosis de E. coli (139) al igual que la ceftazidima, aunque en este último caso la fagocitosis frente a E. coli, P. aeruginosa, E. faecalis, y S. aureus se debe a un efecto directo causado sobre los PMN (44).

La fagocitosis después de la segunda hora de ensayo no tuvo mucho valor, puesto que a partir de esa hora los porcentajes no se elevaron más. En otros casos, algunos autores, realizan ensayos con PMN que prolongan tan sólo durante dos o tres horas a partir del tiempo inicial, ya que consideran que el efecto de las células fagocíticas "in vitro" pierde eficacia después de ese tiempo.

También se observó un sinergismo entre la combinación antimicrobiana (amoxicilina / clavulánico) y los PMN. De la misma forma existía una mayor reducción de bacterias al aumentar la dosis del antibiótico. Esta disminución se estabilizaba al llegar a los 8 µg/ml. Es en esa misma concentración donde se obtenían los mayores porcentajes de fagocitosis y el efecto sinérgico era mayor. Los resultados fueron bastante similares a los obtenidos con amoxicilina sola, debido probablemente a que la concentración antibiótica empleada frente a esta cepa sensible, suponía unas dosis de antibiótico suficientemente elevadas y cercanas a la saturación, de forma que no se apreciaban diferencias significativas.

Con cefotaxima y ceftazidima, ambas cefalosporinas de tercera generación, algunos autores observaban un efecto estimulador de la fagocitosis cuando eran utilizadas en concentraciones subinhibitorias (139 - 142). Este efecto también se observó con dosis suprainhibitorias de cefdinir

(143). En nuestro caso no se comprobó el efecto provocado por dosis inferiores a la CMI de cefotaxima para el neumococo de serotipo 3. A concentraciones mayores se observó una cierta estimulación de la fagocitosis, aunque no de forma muy acusada, y en todo caso muy inferior a la que provocó amoxicilina. Los efectos potenciadores de la fagocitosis por los antimicrobianos β -lactámicos se deben no solamente a la inhibición de las PBPs bacterianas, sino también a que ésta inhibición conduce a una serie de procesos como, la alteración de la estructura de la pared bacteriana, el aumento en la opsonización de la bacteria, la producción de filamentación u otras alteraciones morfológicas, la disminución de la velocidad de crecimiento, etc, procesos que, en algunos casos, van a favorecer la acción de los PMN. Pequeñas variaciones en estas variables al utilizar uno u otro antibiótico van a producir estos cambios en la sensibilidad de la bacteria al efecto fagocítico de los PMN.

Además el antimicrobiano puede actuar de forma directa sobre los PMN provocando un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno y enzimas líticos de los neutrófilos. Aunque generalmente los antibióticos β -lactámicos no alteran estos mecanismos bactericidas de los PMN (39), se ha comprobado que cefotaxima estimula el estallido respiratorio de los neutrófilos. Labro y colaboradores también comprobaron, como ocurría en nuestro caso, que se producía un sinergismo entre los PMN y cefotaxima o cefodocima debido en su caso, a un efecto directo de estos antimicrobianos sobre los PMN y llegaron a la conclusión de que la estimulación de los neutrófilos por ambos tipos de antibióticos era provocada por mecanismos diferentes. Mientras que el incremento de la muerte bacteriana por los neutrófilos en el caso de cefotaxima se debía a un incremento de la respuesta oxidativa de los PMN, en el caso de cefodocima el efecto sinérgico era provocado por una interacción con los mecanismos independientes de Oxígeno de los PMN (47, 144).

En este ensayo el mayor efecto sinérgico con los PMN se produjo igual que con amoxicilina a dosis bajas de antibiótico, lo que parecía indicar que los mecanismos que facilitan la fagocitosis de la bacteria por el PMN se producían a estas concentraciones más bajas de antibiótico.

En cualquier caso, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y comparándolos con las otras cepas estudiadas, podemos decir que esta cepa de serotipo 3 era más resistente a la fagocitosis por los PMN debido, principalmente, a la cápsula tan gruesa que presentaba, como se indicaba en los trabajos que estudiaban las cápsulas de S. pneumoniae, y que la protegía contra el ataque del sistema inmune del huésped. Este efecto ya se había observado al describir el comportamiento de la bacteria frente a los PMN en ausencia de antibiótico.

2.5.2 Serotipo 6

La amoxicilina junto con los PMN provocaron una drástica reducción del número de bacterias de este serotipo 6, incluso en la hora cuarta del ensayo y con concentraciones de 8 y 12 $\mu\text{g/ml}$ su número descendía por debajo de los límites detectables con este tipo de ensayos. Esta fagocitosis tan elevada de los PMN sobre esta cepa también se encontró cuando no se añadía antimicrobiano, lo que nos indicaba que estamos ante una cepa muy sensible a la fagocitosis, a diferencia de la bacteria anterior.

El sinergismo entre antibiótico y PMN en la eliminación del neumococo fue muy elevado durante todo el ensayo.

A partir de una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ no se produjo un aumento significativo de los porcentajes de fagocitosis, por lo que se volvió a comprobar, igual que otros autores, que el efecto estimulador de la amoxicilina sobre el sistema inmune se producía en la mayoría de los casos

a concentraciones de antibiótico no muy elevadas, ya fueran éstas sub-CMI o supra-CMI (133, 134).

Con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina, que era una dosis ligeramente superior a la CMI de esta bacteria, la evolución del número de bacterias creció o se mantuvo estable al menos durante un cierto período de tiempo. Sin embargo, la gráfica que describía el crecimiento bacteriano en presencia de PMN, factores séricos, y esa misma dosis de antibiótico, era descendente, lo que evidenciaba el papel fundamental de los factores séricos y los PMN, junto con la acción del antibiótico en la eliminación de las bacterias. Además, una descripción del crecimiento bacteriano bajo la acción de todos estos factores, predecía de una forma más eficaz de lo que lo hacía la CMI lo que realmente ocurría en el organismo. Por este motivo se podía explicar que determinadas bacterias que "in vitro" no son sensibles a algunos antibióticos como penicilinas, macrólidos (145) y otros (146), si lo sean "in vivo" donde están participando otros factores en colaboración con el antimicrobiano.

Con amoxicilina/clavulánico había un claro sinergismo entre el antimicrobiano y los neutrófilos en la eliminación de las bacterias. Los porcentajes de fagocitosis eran muy altos en todos los casos, aunque con la combinación antimicrobiana no lo fueron tanto como lo eran con amoxicilina sola. Tampoco la reducción del número de bacterias era tan elevada. La combinación antibiótica no resultó ser más eficaz que la amoxicilina sola.

La cefotaxima en combinación con los factores del sistema inmune redujo mucho el número de bacterias, aunque no tanto como la amoxicilina. Al igual que en el caso anterior, con el serotipo 3 de Streptococcus pneumoniae, la amoxicilina obtenía un mejor rendimiento de los neutrofilos y el complemento existente en el suero, aunque en este caso las diferencias que

había entre amoxicilina y cefotaxima no eran tan elevadas como las de la cepa sensible. Se comprobó un gran porcentaje de fagocitosis de los PMN y un elevado efecto sinérgico entre el sistema inmune y el antibiótico durante todo el ensayo.

Cuando se utilizó una concentración de cefotaxima pequeña de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ existía crecimiento bacteriano igual que ocurría con amoxicilina. Sin embargo con esa misma dosis de antibiótico la presencia de PMN conducía a una fase de muerte bacteriana, lo que sugería que era necesaria la presencia de estos componentes para que el antibiótico fuera eficaz a bajas concentraciones, en las que por si solo no era capaz de inducir la muerte bacteriana. Mediante el estudio de estas curvas, obteníamos además unos datos más fiables del comportamiento bacteriano en el organismo y unos datos más ajustados a las experiencias obtenidas "in vivo" (145, 146).

2.5.3 Serotipo 9

Las concentraciones bajas de amoxicilina, 0,5 y 2 $\mu\text{g/ml}$, en combinación con los PMN, aunque disminuían la cinética de crecimiento de esta cepa de neumococo con respecto al control, no conseguían disminuir tanto el número de bacterias como para pasar de una cinética de crecimiento a una curva de letalidad. El porcentaje de fagocitosis con esas dosis de amoxicilina era aun escaso y fue elevandose de forma progresiva hasta 12 $\mu\text{g/ml}$.

En nuestro caso no se comprobaron diferencias significativas entre la cinéticas de crecimiento de bacterias tratadas con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de amoxicilina y las tratadas con esa misma concentración de antimicrobiano y PMN, no hubo efecto sinérgico entre PMN y antibiótico. Con concentraciones iguales a la CMI (2 $\mu\text{g/ml}$) apareció un sinergismo, como también describían algunos autores con dosis sub-CMI (133, 134, 147, 148). Este sinergismo entre los

componentes del sistema inmune y el antimicrobiano se iba acentuando a medida que aumentaba la concentración antibiótica y en este caso era máxima a concentraciones de 12 $\mu\text{g/ml}$, que fue la máxima dosis empleada en este estudio. En otros casos también se observaba el mayor sinergismo a concentraciones superiores a la CMI (135), pero no era siempre así, y podía obtenerse con dosis inferiores (134). Estas diferencias dependen, principalmente, del daño que producen ciertas dosis de antibiótico sobre la bacteria, o bien, de la estimulación provocada por determinadas concentraciones de antibiótico sobre las células fagocíticas del huésped.

En nuestro estudio se comprobó que el efecto que producía el antimicrobiano sobre la bacteria haciéndola más sensible al ataque de los PMN y del sistema inmune y obteniéndose el máximo sinergismo, se conseguía con dosis superiores a la CMI. El antimicrobiano por sí sólo a concentraciones bajas, causaba poco efecto sobre la bacteria (fig. 13), de forma que su cinética disminuyó ligeramente respecto al control, y tampoco provocó un daño suficiente para que el ataque por los PMN fuera efectivo (fig. 14). Esta dosis de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ era escasa para obtener una buena actividad antimicrobiana frente a esta cepa resistente, sin embargo dosis más elevadas actuaban de forma bactericida, tanto solas, como en mayor grado en combinación con los factores del sistema inmune del organismo, de lo que se concluye que se necesitaban mayores concentraciones de antibiótico para eliminar a las bacterias, y para que se observase un efecto sinérgico con los PMN.

La combinación amoxicilina/clavulánico, frente a esta cepa de serotipo 9, mejoró el rendimiento antibacteriano si lo comparabamos con la amoxicilina sola, de forma que los niveles de bacterias eran siempre más bajos con la combinación antibiótica. Otros investigadores obtienen similares resultados en estudios "in vivo" con neumococos (129), o "in vitro" con cepas de S.

aureus no productoras de β -lactamasas (149). Este efecto sobre S. aureus era mayor cuando la bacteria no estaba opsonizada, debido a que se producían cambios morfológicos o fisicoquímicos en la superficie bacteriana que la hacían más sensible o reconocible por los PMN en ausencia de opsoninas (150). Aunque estos investigadores sugerían que el ácido clavulánico era el responsable de los mayores porcentajes de fagocitosis de los PMN, señalaban que este efecto era dependiente de la cepa bacteriana utilizada en el estudio, como también se deduce de nuestro trabajo, puesto que con las cepas anteriores no se observaba dicho efecto. Esta diferencia causada por el clavulánico podría explicarse, bien en un aumento de las lesiones que provocaba el antibiótico a los microorganismos, o bien en un efecto directo sobre los PMN. No hay referencias bibliográficas que revisen este último hecho, aunque si se ha comprobado que el ácido clavulánico tiene una afinidad diferente por las PBPs de las que tiene la amoxicilina, lo que podría explicar que provocase unas lesiones más generalizadas en la bacteria al actuar en combinación con la amoxicilina, de forma que se facilitase el proceso de fagocitosis por los PMN.

Los porcentajes de fagocitosis eran más altos que con amoxicilina sola, sobre todo, en las primeras horas del ensayo. Con concentraciones elevadas de antibiótico y en horas posteriores, donde la amoxicilina provocaba lesiones suficientemente grandes a la bacteria, los porcentajes de fagocitosis se igualaban en ambos casos, incluso eran mayores en ausencia de clavulánico.

El sinergismo con los PMN se observó en todas las dosis antimicrobianas utilizadas.

Los mejores porcentajes de fagocitosis con cefotaxima se conseguían con unas concentraciones de entre 0.5 y 4 $\mu\text{g/ml}$, es decir, a concentraciones subinhibitorias o ligeramente superiores a la CMI como se había comprobado en otros ensayos (139, 142). El sinergismo con los PMN tampoco era más

elevado con dosis mayores de cefotaxima.

La reducción del número de bacterias con cefotaxima y neutrófilos comenzó antes que con amoxicilina. Los porcentajes de fagocitosis también fueron mayores que con amoxicilina a bajas concentraciones de antimicrobiano. Con 2 $\mu\text{g/ml}$ la cefotaxima seguía actuando de forma más eficaz. A partir de 4 $\mu\text{g/ml}$ la amoxicilina disminuía más la cinética de letalidad bacteriana, y los porcentajes de fagocitosis eran más elevados. Se distinguían, por tanto, dos situaciones, una a concentraciones similares a la CMI donde la cefotaxima actuaba mejor que la amoxicilina, y otra a concentraciones superiores a la concentración mínima inhibitoria, donde ocurría el fenómeno contrario. Mientras en casos anteriores los PMN y la amoxicilina se mostraban más eficaces que la cefotaxima, ahora con esta cepa de *S. pneumoniae* este efecto no era tan patente. El grado de eliminación bacteriana por los PMN y distintos antimicrobianos era claramente dependiente de la cepa bacteriana empleada en el estudio. También se ha sugerido la importancia de las diferentes especies de PMN utilizadas en el ensayo lo que podría representar alguna variación en la velocidad de eliminación de los microorganismos tratados con un mismo antibiótico, pero aunque esto pudiera causar algún tipo de variación, la causa principal de tales diferencias era la variabilidad existente entre las distintas cepas microbianas empleadas en el ensayo (151), sobre todo, como es nuestro caso al utilizar organismos grampositivos, donde las discrepancias existentes son siempre mayores (152).

2.5 ESTUDIO DEL SINERGISMO

Los mecanismos por los que los antibióticos modifican la sensibilidad del sistema de defensas del huésped frente a las bacterias son variados. No se ha comprobado que antibióticos como amoxicilina y otras penicilinas influyan de forma directa sobre los PMN, sin embargo, algunos β -lactámicos

como cefotaxima y otras cefalosporinas pueden estimular el estallido respiratorio de los PMN. En este último caso el aumento de la fagocitosis se produciría mediante dos tipos de efectos, uno directo causado sobre los PMN y otro indirecto causado sobre las bacterias, como ocurre en el caso de la amoxicilina.

En este estudio se comprobó que en la mayoría de los casos estudiados (tablas 11-13) se producía un efecto sinérgico entre PMN y antimicrobianos en la eliminación de neumococos. Este resultado era diferente dependiendo de cada molécula antibiótica y para cada cepa de neumococo. También había que tener en cuenta que dicho sinergismo no era dependiente de la reducción bacteriana que provocaba el antimicrobiano sobre las bacterias, ya que por ejemplo con el serotipo 3 se observó una gran reducción bacteriana por causa de la amoxicilina pero el sinergismo no era tan elevado como con otras cepas. El sinergismo es un efecto característico de la unión antimicrobiano-neutrófilo en la eliminación de la bacteria.

Podemos decir que en todos los casos estudiados existía un fenómeno de inmunoestimulación (excepto con alguna concentración baja de antimicrobiano), esto es, una estimulación del sistema inmune por parte de los antibióticos.

Hay que resaltar, como ha quedado demostrado en este estudio, que el efecto sinérgico, que hace aumentar la eficacia del agente antimicrobiano mejorando así su potencial terapéutico, es un objetivo que se intenta conseguir actualmente para todos los nuevos agentes antiinfecciosos. En esta búsqueda incluso, se intenta asociar sustancias que tienen poder microbicida con elementos que activen el sistema de defensas del organismo, como pueden ser los factores estimuladores de colonias de granulocitos y monocitos, ya que un pequeño aumento de la respuesta inmunológica, además del efecto antimicrobiano de los antibióticos, puede hacer traspasar el umbral para la recuperación en un proceso infeccioso, sobre todo en el caso

de individuos inmunocomprometidos.

CONCLUSIONES

1. El efecto causado por los PMN sobre cada cepa de neumococo, en presencia o no de antibiótico, depende de su diferente interacción con la fagocitosis y no de su sensibilidad a los antibióticos.

2. A través del análisis de las cinéticas de crecimiento bacterianas obtenemos una mayor correlación entre los ensayos realizados "in vitro" y los realizados "in vivo" y unos datos más predictivos de la situación real, que únicamente con el estudio de las CMI.

3. Amoxicilina se muestra más eficaz que cefotaxima en la eliminación de los serotipos 3, 6 y 9 de S. pneumoniae a concentraciones terapéuticas de antibiótico. Concentraciones inferiores son más propicias para la actuación de cefotaxima.

4. La amoxicilina junto con los PMN es más efectiva en la eliminación bacteriana que la cefotaxima, excepto con bajas concentraciones de antimicrobiano (0,5 y 2µg/ml) frente al serotipo 9.

5. Las concentraciones de antibiótico más eficaces para favorecer el efecto fagocítico de los PMN se corresponden con las menores dosis ensayadas, ya que en la mayoría de los casos estudiados los porcentajes de fagocitosis no se incrementan, en gran medida, al aumentar la dosis de antimicrobiano.

6. Con todas las concentraciones superiores a la CMI de los antimicrobianos utilizados se obtiene sinergismo entre los PMN y los antibióticos en la eliminación de S. pneumoniae.

7. El grado de eliminación bacteriana depende de las relaciones que se establecen entre los factores implicados en el proceso, sistema inmune, tipo de antibióticos y concentración de estos, y fundamentalmente del microorganismo que provoque dicho proceso infeccioso.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Mc Donald, P.J., Craig, W.A., Kwin, C.M. Persistent effect of antibiotics on Staphylococcus aureus after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 1977; 135:217-223.
- 2.- Bundtzen, R.W., Gerber, A.V., Cohn, D.L., Craig, W.A. Post antibiotic suppression of bacterial growth. *Rev. Infect. Dis.* 1981; 3:28-37.
- 3.- Pruul, H., Mc Donald, P.J. damage to bacteria by antibiotics "in vitro" and its relevance to antimicrobial chemotherapy: a historical perspective. *J. Antimicrob. Chemother.* 1988; 21:695-700.
- 4.- Weinstein, L., Dalton, A.C. Most determinants of response to antimicrobial agents. *New England J. Med.* 1968; 279:580-588.
- 5.- Labro, M.T., El Benna, J. Effects of anti-infectious agents on polymorphonuclear neutrophils. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1991; Vol 10, No 2:124-131.
- 6.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Geinsberg, H.S., Wood, W.D. En: *Microbiology*. Herper and Row, New York and John Weatherhill, Inc. Tokyo. 1969; pp 654.
- 7.- Labro, M.T. Immunomodulation by antibacterial agents. *Drugs.* 1993; 45(3):319-328.
- 8.- Rammelkamp, C.H., Keefer, C.S. Penicillium: its antimicrobial effect in whole blood and serum for hemolytic streptococcus and Staphylococcus aureus. *J. Clin. Invest.* 1943; 22:649-647.
- 9.- Alexander, J. W., Good, R.A. Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 1968; 71:971-983.
- 10.- Mc Donald, P.J., Wetherall, B.L., Pruul, H. Postantibiotic leukocyte enhancement: Increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 1981; 3:38-44.
- 11.- Mc Donald, P.J., Pruul, H., Wetherall, B. Susceptibility of antibiotic-damaged bacteria

to leukocytes. In proceedings of the 13th international congress of chemotherapy 1983. edited by K.H. Spitzzy and K. Karrer. Verlag H. Egermann. Viena. Austria, part. 53 pp 2-5.

12.- Pruul, H., Mc Donald, P.J. Enhancement of leukocyte activity against E. coli after brief exposure to chloranphenicol. Antimicrob. Agents Chemother. 1979; 16:695-700.

13.- Pruul, H., Wetherall, B.L. Mc Donald, P.J. Enhanced susceptibility of E. coli to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after "in vitro" incubation with chloranphenicol. Antimicrob. Agents Chemother. 1981; 19:945-951.

14.- Pruul, H., Hill, N., Mc Donald, P.J. Enoxacin-induced alterations of susceptibility of pneumococci and pseudomonas to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes, J. Antimicrob. Chemother. 1984; 14 (Suppl. C):19-31.

15.- Pruul, H., Lewis, G., Mc Donald, P.J. Enhanced susceptibility of gram-negative bacteria to phagocytic-killing by human polymorphonuclear leukocytes after brief exposure to aztreonam. J. Antimicrob. Chemother. 1988; 22 (Suppl. B):675-686.

16.- Mandell, L.A., Afnan, M. Interactions among subinhibitory antibiotics, aerobic gram-negative rods, and human polymorphonuclear neutrophils. The influence of antibiotics on the host-parasite. Relationship III. Edited by Gillinssen, G., Opferkuch, W., Peters, G., Pulverer, G. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1989. pp.133-143.

17.- Willians, P. Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interactions of complement and immunoglobulins with Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 1987; May:758-762.

18.- Lingaas, E., Midtredt, T. The influence of cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam on phagocytosis by human neutrophils "in vitro". J. Antimicrob. Chemother. 1989; 23:701-710.

19.- Greenwood, D., O'Grady, F., Comparison of the responses of Escherichia coli and Preoteus mirabilis to seven betalactam antibiotics. J. Infect. Dis. 1973; 128:211-222.

- 20.- Klainer, A.S., Roussel, R.R.B. Effect of the inhibition of protein synthesis on the Escherichia coli cell envelope. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1974; 6:216-224.
- 21.- Schultz, R.D., Donne, H.W., Heist, C.E. Effects of sublethal concentrations of penicillin G on groups C, E, K and L streptococci. *American J. Veterinary Research* 1969; 30:1451-1459.
- 22.- Michel, J., Ferne, M., Borinski, R., Kornberg, Z., Bergner-Rabinowitz, S., Ginsberg, I. Effects of subminimal inhibitory concentrations of chloramphenicol, erythromycin and penicillin on group A streptococci. *Eur. J. Clin. Microb.* 1982; 1:375-380.
- 23.- Gemmell, C.G., O'Dowd, A. Regulation of protein A biosynthesis in Staphylococcus aureus by certain antibiotics: its effects on phagocytosis by leukocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 1983; 12:587-597.
- 24.- Milatovics, D., Brabeny, I., Verhoef, J. Clindamycin enhances opsonization of Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 24:413-417.
- 25.- Van Oss, C.J. Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annual Review Microb.* 1978; 32:19-39.
- 26.- Lorian, V., Gemmell, G.C. Effect of low antibiotic concentration on bacteria: effect on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. In *antibiotics in laboratory medicine*, 1986 2nd edn. (Lorian, V., Ed.) pp. 659-660. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- 27.- Lam, C., Turnowsky, F., Högenauer, G., Schütze, E. Effect of diazaborine derivative (Sa 84474) on the virulence of Escherichia coli. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 20:37-45.
- 28.- Efrati, C., Sacks, T., Neleman, N., Lahav, M., Ginsburg, I. The effect of leukocyte hydrolases on bacteria. The combined effect of leukocyte extracts, lysozyme, enzyme "cocktails", and penicillin on the lysis of Staphylococcus aureus and group A Streptococci "in vitro". *Inflammation.* 1976; 1:371-407.
- 29.- Lorian, V., Atkinson, B., Kim, Y. Effect of rifampin and oxacillin on the ultrastructure

- and growth of Staphylococcus aureus. *Reviews Infect. Dis.* 1983; 5, Suppl. 3:418-427.
- 30.- Choopra, I. Antibiotics and bacterial adhesion. *J. Antimicrob. Chemother.* 1986; 18:553-554.
- 31.- Pruul, H., Wetherall, B., Mc Donald, P. "In vitro" killing of erythromycin-exposed group A streptococci by polymorphonuclear leukocytes. *European J. Clin. Microb.* 1986; 5:405-410.
- 32.- Pelus, L.M., Broxmeyer, H.E. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation specificities of prostaglandin E and lactoferrin. *J. Exp. Med.* 1979; 150:277-292.
- 33.- Bellanti, J.A. En: *Inmunología II*. 27. Ed. Nueva Ed. Interamericana S.A. México. 1980.
- 34.- Gigula, N.B., Woleert, L. Cytoplasmic and cell motility. In: *Current opinion in cell biology*. Ed. N.B. Gigula and L. Woleert. (Vol.1), Current Science Limited. U.S.A. 1988.
- 35.- Messner, R.P., Jelinek, J. Receptor for human gamma G globulin on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1970; 49:2165.
- 36.- Witemeyers, S., Van Epps, D.E. A familial defect in cellular chemotaxis associated with headheadedness and recurrent infection. *J. Pediatr.* 1976; 89:33.
- 37.- Gallin, J.L. Abnormal phagocyte chemotaxis: Pathophysiology, clinical manifestations and management of patients. *Rev. Infect. Dis.* 1981; 3:1196.
- 38.- Pérez, H.D., Goldstein, I.M., Webster, R.O., Henson, P.M. Enhancement of the chemotactic activity of human C5a desarg by an anionic polypeptide ("cochemotaxin") in normal serum and plasma. *J. Immunol.* 1981; 126: 800-804.
- 39.- Milatovic, D. Antibiotics and phagocytosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1983; Vol. 2. 5:414-425.
- 40.- Gemmell, C. G. Antibiotics and neutrophil function-potential immunomodulating effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 1993; 31 suppl. B:23-33.

-
- 41.- Dosset, J.H., Williams, R.C., Quie, P.G. Studies on interaction of bacteria serum factors and polymorphonuclear leukocytes in mothers and newborns. *Pediatrics*. 1969; 44:49.
- 42.- Anwar, A.R., Kay, A. Membrane receptors for Ig and complement (C4, C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia. *J.Immunol*. 1977; 119:976.
- 43.- Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., Quie, P.J. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infection and immunity*. 1977; 15:760-764.
- 44.- Gutierrez, J., Liébana, J., Maroto, M.C., Piédrola, G. Efecto de las concentraciones subinhibitorias de ceftazidima, clindamicina y gentamicina sobre la fagocitosis de bacterias aerobias por leucocitos neutrófilos. *Rev. Esp. Quimiot*. 1990;3,1:47-53.
- 45.- Raponi, G., Vreede, R.W., Rozenberg-Arska, M., Hoepelman, I.M., Keller, N., Verhoef, J. The influence of subminimal inhibitory concentrations of netilmicin and ceftriaxone on the interaction of *Escherichia coli* with host defenses. *J. Antimicrob. Chemother*. 1989; 18:233-237.
- 46.- Klebanoff, S.J. In J.A. Bellanti and D.H.Dayton (eds.): The phagocytic cell in host resistance. New York, Raven Press. 1975.
- 47.- Labro, M.T., Babin-Chebaye, C., Hakim, J. Effects of cefotaxime and cefodime on human granulocyte functions "in vitro". *J. Antimicrob. Chemother*. 1986; 18:233-237.
- 48.- Hugly, T.E. Bioactive factors of the blood complement system. In: Proteins in biology and medicine. New York Academic Press. 1983; 91-117.
- 49.- Pruul, H., Mc Donald, P.J. Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytosed by human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother*. 1990; 25:91-101.
- 50.- Tomasz, A. From penicillin binding protein to the lysis and death of bacteria: a 1979 view. *Rev. Infect. Dis*. 1979; 1:434-467.

-
- 51.- Best, G.K., Best, N.H., Koval, A.V. Evidence for participation of autolysins in bactericidal action of oxacillin on Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1970; 6:825-830.
- 52.- Tomasz, A., Waks, S. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975; 72:4162-4166.
- 53.- Spratt, B.G. Temperature-sensitive cell division mutants of Escherichia coli with termolabile penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* 1977; 191:293-305.
- 54.- Brown, D.F.J., Reynolds, P.E. Intrinsic resistance to β -lactam antibiotic in Staphylococcus aureus. *F.E.B.S. Lett.* 1980; 122:275-278.
- 55.- Hartman, B.J., Tomasz, A. Low affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 1984; 158:513-516.
- 56.- Ubukata, K., Yamashita, N., Konno, M. Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1985; 27:851-857.
- 57.- Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., Foulds, J. Porin channels in *Escherichia coli* studies with β -lactams in intact cells. *J. Bacteriol.* 1983; 153:232-240.
- 58.- Curtis, N.Q.C., Orr, D., Ross, G.W. Boulton, M.G. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979; 16:533-539.
- 59.- Grimer, R.J., Karpinski, M.R.K., Andrews, J.M., Wise, R. Penetration of amoxicillin and clavulanic acid into the bone. *Chemotherapy.* 1986; 32:185-191.
- 60.- Donowitz, G.R., Mandell, G.L. Beta-lactam antibiotics. *New England J. Med.* 1988; Vol.318 N.7:419-426.

- 61.- Coombes, J.D. Metabolism of cefotaxime in animals and humans. *Rev. Infect. Dis.* 1982; 4 (suppl.):S325.
- 62.- Schrunner, E., Limbert, M., Seeger, K. The in vitro antimicrobial activity of desacetylcefotaxime compared to other related beta-lactams. *Diagn. Microl. Infec. Dis.* 1984; 2(suppl.):13S.
- 63.- Greenwood, D., O'Grady, F., Baker, P. An in vitro evaluation of clavulanic acid, a potent, broad spectrum β -lactamase inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 1979; 5:539-549.
- 64.- Spratt, B.G., Tobanaputra, V.Z., Zimmerman, W. Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977; 12:406-409.
- 65.- Jackson, D., Cooper, D.L., Hardy, T.L., Langley, P.F., Stanforth, D.H., Sutton, J.A. Pharmacokinetic, toxicological and metabolic studies with Augmentine. In: Augmentine, clavunated-potentiated amoxicillin. *Experta Medica*. Ed: G.N. Rolinson, A. Watson. 87-105. Amsterdam 1980.
- 66.- Pukander, J., Luotonen, J., Sipilä, M. Incidence of acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* 1982; 93:447-453.
- 67.- Karma, P., Palva, T., Kouvalainen, K. Finnish approach to the treatment of acute otitis media. Report of the finnish consensus conference. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1987; 96:S1-19.
- 68.- Macfarlane, J.T., Finch, R.G., Ward, M.J. Macrae, A.D. Hospital study of adult community acquired pneumonia. *Lancet.* 1982; 2:255-258.
- 69.- World Health Organization. Programme for the control of acute respiratory infections. Pneumococcal conjugate vaccines. Geneva. Switzerland: WHO, 1994; report WHO/ARI/94.34.
- 70.- Van Dam J.E.G., Fleer, A., Snippe, H. Immunogenicity and immunochemistry of

- Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides. Antonie Van Leeuwenhoek. 1990; 58:1-47.
- 71.- Rogers, H.J., Perkins, H.R., Ward, J.B. In: Microbial cells and membranes. 1980; 437-460. Ed. Chapman and Hall. London.
- 72.- Eggleton, P., Gargan, R., Fisher, D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. J. Immunological Methods. 1989; 121:105-113.
- 73.- Dioguardi, N., Agustoni, A., Fiorelli, G., Lomanto, B. Characterisation of lactic deshydrogenase of normal human granulocytes. J. Lab. Clin. Med. 1963; 61:713.
- 74.- Jones, R.N., Barry, A.L., Garan, T.L., Wahington, J.A. Susceptibility test: Microdilution and macrodilution broth procedures. In: Manual of clinical microbiology. 4th ed. 1985. E.H. Lennette, A. Ballows, W.J. Hausler, H.J. Sadowy. (Ed.). American Society for Microbiology. 972-977. Washington D.C.
- 75.- Sánchez-Puelles, J.M., Ronda, C., García, J.L., García, P., López, R., García, E. Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant detected in the *lyt A* gene. Eur. J. Biochem. 1986; 158:289-293.
- 76.- Liñares, J., Tubau, F., Alcaide, F., Mariscal, D., Ardanuy, C., Martín, R. Actividad bactericida de cinco antibióticos betalactámicos frente a Streptococcus pneumoniae.
- 77.- Estadística para biología y ciencias de la salud. J. S. Milton. 2ª ed. Radford University (Ed.). 1994. Interamericana-McGraw-Hill.
- 78.- Barakett, V., Lesage, D., Delisle, F., Richard, G., Petit, J.C. Killing kinetics of imipenem against penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae. J. Antimicrob. Chemother. 1994; 33:1025-1028.
- 79.- Hindler, J.A., González, A.H., Drake, T. Stability of viable bacterium counts in liquid media used for preparation of inocula and subsequent impact on antimicrobial susceptibility

test results. *J. Clinical Microbiol.* 1990; Vol 28; 6:1271-1275.

80.- McFarland, J. Nephelometer: on instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the index for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 1907; 14:1176-1275.

81.- Lichtman, M.A., Weed, R.I. The monovalent cation content and adenosine triphosphatase activity of human normal leukemic granulocytes and lymphocytes: Relationship to cell volume and morphologic age. *Blood.* 1969; 34:645.

82.- Nelson R.D., Quie, P.G., Simmons, R.L. Chemotaxis under agarose: A new simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* 1975; 115:1650.

83.- Jarstrand, C., Lahnberg, G., Berghem, L. Human granulocyte function during dextran infusion. *Acta Chir. Scand.* 1979; 489:S.279.

84.- Hill, R.S., Norris-Jones, R., Still, B., Brooks, D.E. Surface charge and hydrophobic properties of fresh and cryopreserved blood phagocytes as determined by partitioning in two phase aqueous polymer systems. *Am. J. Haematol.* 1986; 21:249.

85.- Wakefield, J.S.J., Gale, J.S., Berridge, M.V., Jordan, T.W., Ford, H.C. Is percoll innocuous to cells ?. *Biochem. J.* 1982; 202:795.

86.- Roth, J.A., Kaeberle, M.L. Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. *J. Immunol. Methods.* 1981; 45:153.

87.- Babior, B.M., Cohen, H.J. Measurement of neutrophils function: phagocytosis, degranulation, the respiratory burst and bactericidal killing. In: *Methods in haematology.* M.J. Cline (Ed.). 1981; Vol 3:1. Churchill-Livingstone. New York.

88.- Leigh, P.C.J., Van Furth, R., Van Zwet, T.L. In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In *Handbook of*

experimental immunology. D.M. Weir (Ed.). 1986; 461. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

89.- Gargan, R.A., Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J.M.T. Failure of watter to lyse polymorphonuclear neutrophils completely. Role of pH and implications for assessment of bacterial killing. J. Immunol. Methods. 1989; 124:289-291.

90.- López, R., Ronda-Lain, C., Tapia, A., Waks, S.B., Tomasz, A. Suppression of the lytic and bactericidal effects of cell wall inhibitory antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 1976; 10:697-706.

91.- Tomasz, A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 1979; 33:113-137.

92.- Lawrence, E.B., Allan, J.G. β -Lactam antibiotics: Mode of actions and bacterial resistance. In antibiotics in laboratory medicine, 1986 3rd edn. (Lorian, V., Ed.) pp. 599-664. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

93.- Hakenbeck, R., Ellerbrok, H., Briese, T., Handwerger, S., Tomasz, A. Penicillin-binding protein of penicillin-susceptible and resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the β -lactam binding site. Antimicrob. Agents Chemother. 1986; 30:553-558.

94.- Hakenbeck, R., Tarpay, M., Tomasz, A. Multiple changes of penicillin-binding protein in penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 1980; 17:364-371.

95.- Hakenbeck, R., Tornette, S., Adkinson, N.F. Interaction of non-lytic β -lactams with penicillin-binding proteins in Streptococcus pneumoniae. J. Gen. Microbiol. 1987; 133:755-760.

96.- Laible, G., Hakenbeck, R. Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant laboratory mutants of Streptococcus pneumoniae. Mol. Microbiol. 1987; 1:355-363.

- 97.- Malouin, F., Bryan, L.E. Modification of penicillin-binding proteins as mechanism of β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 30:1-5.
- 98.- Percheson, P.B., Bryan, L.E. Penicillin-binding components of penicillin susceptible and resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 12:390-396.
- 99.- Zigelboim, S., Tomasz, A. Penicillin-binding proteins of multiple antibiotic-resistant South African strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 17:434-442.
- 100.- Handwerger, S., Tomasz, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7:368-386.
- 101.- Matthew, M., Hedges, R.W. Analytical isoelectric-focusing of R factor-determined β -lactamases: Correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* 1976; 125:713-718.
- 102.- Toumanen, E. Phenotypic tolerance: The search for β -lactam antibiotic that kill non-growing bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 1986; 8(S3):S279-S291.
- 103.- Toumanen, E., Durack, D.T., Tomasz, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 30:521-527.
- 104.- Krogstad, D.J., Parquette, A.R. Defective killing of enterococci: A common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 17:965-968.
- 105.- Tomasz, A., Albino, A., Zanati, E. Multiple antibiotics resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature.* 1970; 227:138-140.
- 106.- Horne, D., Tomasz. Factors affecting sensitivity of group B streptococci to an exogenous murein hydrolase. *Can. J. Microbiol.* 1985; 31:417-422.
- 107.- Dailey, D.C., Kaiser, A., Schlomer, R.H. Factors influencing the phagocytosis of *Clostridium difficile* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1987; 55:1541-

1546.

108.- Vergheze, A., Haire, C., Franzus, B., Smith, K. LY146032 in a hamster model of Staphylococcus aureus pneumonia: effect on in vivo clearance and mortality and in vitro opsonophagocytic killing. *Chemotherapy*. 1988; 34:497-503.

109.- Gemmell, C.G., Amir, M.K.A. Antibiotic-induced changes in streptococci with respect to their interaction with human polymorphonuclear leukocytes. In: *Current Chemotherapy and Infectious Disease*. J.D. Nelson, C. Grassi. (ed.). 1980; 810-812. American Society for Microbiology. Washington. D.C.

110.- Gemmell, C.G., Peterson, P.K., Schmeling, D., Kim, Y., Matthews, J., Wannamaker, L., Quie, P.G. Potentiation of opsonization and phagocytosis of Streptococcus pyogenes following growth in the presence of clindamycin. *J. Clin. Invest.* 1981; 67:1249-1256.

111.- Atkinson, B.A., Amaral, L. Sublethal concentrations of antibiotics, effects on bacteria and the immune system. *Crit. Rev. Microbiol.* 1982; 9:101-138.

112.- Griffith, F. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 1928; 27:113-159.

113.- Rich, A.R., McKee, C.M. The pathogenicity of avirulent pneumococci for animals deprived of leukocytes. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1939; 64:434-446.

114.- Pankuch, G.A., Visalli, M.A., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C. Activities of oral and parenteral agents against penicillin-susceptible and resistant pneumococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39:1499-1504.

115.- Shah, P.M., Junghanns, W., Stille, W. Dosis-wirkungs-beziehung der bakterizidie bei E. coli, K. pneumoniae, and Staphylococcus aureus. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1976; 101:325-328.

116.- Craig, W.A., Ebert, S.C. Killing and regrowth of bacteria in vitro. *Review Scand. J. Infect. Dis.* 1991; 74(S):63-70.

- 117.- Craig, W.A., Gudmundsson, S. The postantibiotic effect. In: Antibiotics in laboratory medicine. V. Lorian. 3^a Ed. (ed.). 1991; 403-431. Williams and Wilkins. Baltimore.
- 118.- Hanberger, H., Nilsson, L.E., Maller, R., Nilsson, M. Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria: initial killing, morphology and postantibiotic effect. Review Scand. J. Infect. Dis. 1991; 74(S):118-123.
- 119.- Nishida, M., Marakowa, T., Kamimura, T., Okada, N. Bacterial activity of cephalosporins in an in vitro model simulating serum levels. Antimicrob. Agents Chemother. 1978; 14:6-12.
- 120.- Nishino, T., Nakazawa, S. Bacteriological study on effects on beta-lactam group antibiotics in high concentrations. Antimicrob. Agents Chemother. 1976; 9:1033-1042.
- 121.- Kirby, W.M.M. Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant staphylococci. J. Clin. Invest. 1945; 24:165-169.
- 122.- Holm, S.E., Tornqvist, I.O., Cars, O. Paradoxical effects of antibiotics. Review Scand. J. Infect. Dis. 1991; 74(S):113-117.
- 123.- Geslin, P., Fremaux, A., Sisia, G. Streptococcus pneumoniae: état actuel de la sensibilité aux bêta-lactamines en France. Mise à point du Centre National de Reference. Med. Malad. Infect. 1991; 21:3-11.
- 124.- Barakett, V., Lesage, F., Delisle, F., Guidet, B., Burghoffer, B., Richard, G. Activité bactériostatique et cinétique de bactéricide de huit antibiotiques vis-à-vis de sept souches de pneumocoques résistant à la pénicilline. G. Pathol. Biol. 1992; 40:483-491.
- 125.- Pallarés, R., Gudiol, F., Liñares, J., Ariza, J., Ruff, G., Murgu, L. Risk factors and response to antibiotic therapy in adults with bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. N. Engl. J. Med. 1987; 317:18-22.
- 126.- Viladrich, P.F., Gudiol, F., Liñares, J., Ruff, G., Ariza, J., Pallarés, R. Characteristics and antibiotic therapy of adult meningitis due to penicillin-resistant pneumococci. Am. J.

Med. 1988; 84:839-846.

127.- García-Leoni, M.E., Cercenado, E., Rodeño, P., Bernaldo de Quiros, C.L., Martínez-Hernández, D., Bouza, E. Susceptibility of Streptococcus pneumoniae to penicillin: a prospective microbiological and clinical study. Clin. Infect. Dis. 1992; 14:427-435.

128.- Muñoz, R., Dowson, C.G., Daniels, M., Coffey, C.J., Martin, C., Hakenbeck, R. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Molecular Microbiol. 1992; 17:2461-2465.

129.- Smith, G.M., Abbott, K.H., Slocombe, B. Penicillin-resistant pneumococcus: therapy of experimental respiratory infections in rats with amoxicillin and amoxicillin-clavunate, abstr, p28. In: Program and abstracts of the 6th International Congress on Infectious Diseases. 1994. Prague.

130.- Horne, D., Tomasz, A. Hypersusceptibility of penicillin treated group B streptococci to bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Chemother. 1981; 12:587-597.

131.- Carsenti-Etesse, H., Durant, J., De Salvador, F., Bensoussan M., Bensoussan, F., Pradier, C., Thabaut, A., Dellamonica, P. In vitro development of resistance to β -lactam antibiotics in Streptococcus pneumoniae. J. Antimicrob. Chemother. 1995; 36:417-423.

132.- Hunter, P.A., Coleman, K., Fisher, J., Taylor, D. In vitro synergistic properties of clavulanic acid with ampicillin, amoxicillin and ticarcillin. J. Antimicrob. Chemother. 1980; 6:455-470.

133.- Watanabe, Y., Tawara, S., Mine, Y., Kikuchi, H. Synergism of cephalosporins at subinhibitory concentrations and polymorphonuclear leukocytes on phagocytic killing of Escherichia coli and its mode of action. J. Antibiotics. 1986; 34:294-303.

134.- Daschner, F.D. Antibiotics and host defence with special reference to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. J. Antimicrob. Chemother. 1985; 16:135-141.

- 135.- De Nollin, S., Van Belle, H., Goosens, F., Thone, F., Borgers, M. Cytochemicals and biochemical studies of yeast after in vitro exposure to miconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977; 1:500-513.
- 136.- Milatovic, D. Effects of subinhibitory antibiotics concentrations on the phagocytosis of Staphylococcus aureus. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1982; 1:97-101.
- 137.- Burgaleta, C., Soria, H., Hernández, F. Stimulatory effects of carbenicillin and ticarcillin on the adhesion and spreading of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 1985; 15:729-736.
- 138.- Burgaleta, C., Sánchez, B., Moreno, T., Soria, H., Bouza, E., Martínez, F. In vitro effects ureidopenicillins of human polymorphonuclear leukocytes. *Drug Res.* 1985; 35: 958-960.
- 139.- Andreana, A., Perna, P., Utili, R., Dalillo, M., Ruggiero, G. Increased phagocytosis and killing of Escherichia coli treated with subinhibitory concentrations of cefamandole and gentamicin in isolated vabliers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 25:182-186.
- 140.- Bassaris, H.P., Lianou, P.E., Votta, E.G., Papavassiliou, J.T. Effects on subinhibitory concentrations of cefotaxime on adhesion and polymorphonuclear leukocyte function with gramnegative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1984; 14(Suppl.B):91-96.
- 141.- Gnarpe, H., Blasheim, J., Blanquist, C., Lundobäck, A., Svensson, A.C. The in vitro influence of ceftazidime on host defense mechanism. *J. Antimicrob. Chemother.* 1984; 13:369-375.
- 142.- Dascher, F.D., Bassler, M., Grundou, D., Dieterle, L., Just, H.M. Comparison of the in vitro activity of ceftazidime in culture, in serum and in combination with granulocytes. *Immun. Infekt.* 1983; 11:221-228.
- 143.- Labro, M.T., Babin-Chevaye, C., Hakin, J. Influence of subinhibitory concentrations of ceftriaxone on opsonization and killing of Pseudomonas aeruginosa by human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother.* 1988; 22:341-352.

- 144.- Labro, M.T., Amit, N., Babin-Chevaye, C., Hakin, J. Cefodime (HR221) potentiation of human neutrophil oxygen-independent bactericidal activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 19:331-341.
- 145.- Bouza, E. Infección neumocócica. Patrones de susceptibilidad antibiótica en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1993; 11(Supl.1):15-22.
- 146.- Elliot, G.R., Peterson, P.K., Verbrugh, H.A., Freiberg, M.R., Hoidal, J.R., Quie, P.G. Influence of subinhibitory concentrations of penicillin, cefalothin, and clindamycin on Staphylococcus aureus growth in human phagocytic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 22:781-784.
- 147.- Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F. Enhanced phagocytosis, killing, and serum sensitivity of Escherichia coli and Staphylococcus aureus treated with sub-MICs of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32:1012-1018.
- 148.- Lam, C., Georgopoulos, A., Laber, G., Schutze, E. Therapeutic relevance of penicillin-induced hypersensitivity of Staphylococcus aureus to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 26:149-154.
- 149.- Pascual, A., Martínez-Martínez, L., Aragón, J., Perea, E.J. Effect of amoxicillin and clavulanic acid, alone and in combination, on human polymorphonuclear leukocyte function against Staphylococcus aureus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1989; 8:277-281.
- 150.- Veringa, E.M., Verhoef, J. Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody and complement dependent phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes of Staphylococcus aureus. *Chemotherapy* 1987; 33:243-249.
- 151.- Root, R.K., Isturiz, R., Molavi, A., Metcalf, J.A., Malech, H.L. Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci. *J. Clin. Invest.* 1981; 67:247-259.
- 152.- Gemmell, C.G., Peterson, P.K., Schmeling, D., Kim, Y., Mathews, J., Wannamaker, L., Quie, P.G. Potentiation of opsonized phagocytes of Streptococcus pyogenes

following growth in the presence of clindamycin. *J. Clin. Invest.* 1981; 67:1249-1256.